



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE CIENCIAS

Evaluación fitoquímica y farmacológica de  
*Euphorbia dioeca* Kunth (Euphorbiaceae)  
para el control de enfermedades  
crónico–degenerativas

T E S I S  
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
B I Ó L O G O  
P R E S E N T A :  
SOL CRISTIANS NIIZAWA



Tutora: Dra. Helia Reyna Osuna Fernández

2006



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## Hoja de datos del jurado

Datos del alumno.

Cristians

Niizawa

Sol

TE. 55 15 07 65

Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Ciencias

Biología

Datos del tutor.

Dra.

Helia Reyna

Osuna

Fernández

Datos del sinodal 1.

M.V.Z.

Héctor Alfonso

Malagón

Rivero

Datos del sinodal 2.

Dra.

Alicia Enriqueta

Brechú

Franco

Datos del sinodal 3.

Dra.

Martha Juana

Martínez

Gordillo

Datos del sinodal 4.

M. en C.

Guillermo Julio

Ramírez

Ávila

Datos del trabajo escrito.

Evaluación fitoquímica y farmacológica de *Euphorbia dioeca* Kunth (Euphorbiaceae) para el control de enfermedades crónico-degenerativas.

89 pp.

2006

Este desenlace escrito va dedicado a Cristina y Jorge, alias *mamá* y *papá*, que entre pinceladas y notas musicales me enseñaron que las cosas se deben hacer con el corazón; y a buscar los sueños en las actividades que realmente te llenan, haciendo más felices los días que van construyendo mi vida.

Y también va para Azul y Xul, que entre juegos y peleas me abrieron los ojos a un sinfín de escenarios, me aconsejaron y me instruyeron, redondeando a cada momento mi existir.

*Y deberás plantar  
y ver así a la flor nacer  
y deberás crear  
si quieres ver a tu tierra en paz  
el sol empuja con su luz  
el cielo brilla renovando la vida  
y deberás amar  
amar, amar hasta morir  
y deberás crecer  
sabiendo reír y llorar  
la lluvia borra la maldad  
y lava todas las heridas de tu alma  
de ti saldrá la luz  
tan sólo así serás feliz  
y deberás luchar  
si quieres descubrir la fe  
la lluvia borra la maldad  
y lava todas las heridas de tu alma  
este agua lleva en sí  
la fuerza del fuego  
la voz que responde por ti  
por mí ...  
y esto será siempre así  
quedándote o yéndote.*

*Luis Alberto Spinetta*

El presente trabajo se llevó a cabo en la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), bajo la dirección de la Dra. Reyna Osuna Fernández.

Las pruebas de de inhibición de  $\alpha$ -glucosidasas, así como las pruebas citotoxicidad en líneas celulares tumorales se realizaron en el Centro de Investigación Biomédica del Sur (CIBIS-IMSS), Xochitepec, estado de Morelos, bajo la asesoría del M. en C. Guillermo Ramírez Ávila y el M. en C. Daniel Alonso Cortés, respectivamente.

Las pruebas cualitativas para los principales grupos de metabolitos secundarios se desarrollaron en el Laboratorio de Fitoquímica, Facultad de Ciencias, UNAM, con la asesoría de la Q.A. Verónica Muñoz Ocotero.

## Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Ciencias que a través de la actitud de sus profesores supo formar en mí un criterio de ética y desarrollo profesional.

A la Dra. Reyna Osuna a quien agradezco todo el tiempo invertido para dirigir esta tesis, su confianza, su paciencia y los consejos que acertadamente fue depositando en mí, no sólo en el ámbito académico, sino también en el personal, brindándome su amistad.

A la Dra. Martha Martínez, quien fue sinodal de este trabajo, enriqueciéndolo con sus observaciones y comentarios. Gracias también por mostrarme el mundo de la botánica y ayudarme a comprenderlo cada día mejor.

A la Dra. Alicia Brechú por revisar la tesis, acrecentarla con sus acotaciones y por auxiliarme en los distintos periodos en los que se iba concibiendo este trabajo de investigación.

Al M. en C. Guillermo Ramírez por sus comentarios que perfeccionaron la tesis, por su asesoría en las distintas técnicas relacionadas con la inhibición de  $\alpha$ -glucosidasas y por todas las consideraciones que me brindó durante mi estadía en Xochitepec.

Al M.V.Z. Héctor Malagón por haber aceptado ser sinodal de este trabajo, sus observaciones ayudaron a mejorar el mismo, además de toda la asesoría que brindó con respecto al manejo y estandarización de los modelos farmacológicos animales.

Al Dr. Guillermo Laguna por sus consejos que condujeron muchos pasos a lo largo de este proyecto de investigación.

A la Q.A. Verónica Muñoz por su asesoría en las pruebas cualitativas para los principales grupos de metabolitos secundarios, su interés en esta tesis y las atenciones que hicieron agradable la colaboración con el Laboratorio de Fitoquímica, a cargo de la Dra. Cristina Pérez-Amador.

Al M. en C. Daniel Alonso por haberme dirigido en la técnica para realizar las pruebas de citotoxicidad, así como sus observaciones al momento de analizar los resultados obtenidos.

Al M.V.Z. Mario Soriano y a todo el personal de bioterio de la Facultad de Ciencias, que les dieron asilo y cuidados a mis ratas y me permitieron trabajar en sus instalaciones.

Al Dr. Gabriel Guizar Sahún y a la Sra. Laura Baldwin del Proyecto Camina, A.C., por proporcionar las ratas cepa Long Evans que fungieron como modelo animal para la realización de las pruebas farmacológicas.

A la Dra. Laura López y a la M. en C. Alethia Avendaño por facilitarme el espacio para realizar algunas etapas de la tesis en el Laboratorio de Bioquímica y Fisiología Vegetal de la Universidad Autónoma Metropolitana, campus Iztapalapa.

A Gabriel Solís por sus consideraciones que me ayudaron en los momentos en que la situación se puso difícil.

A todas las personas del Laboratorio de Desarrollo en Plantas y el taller de Plantas Medicinales cuya agradable convivencia hizo posible desarrollar algunas etapas de este trabajo de investigación. En especial a Viridiana que me echó la mano en tantas partes de este trabajo y me brindó su amistad en todo momento.

A toda la gente del CIBIS que me apoyaron en todo lo que necesitaba durante mi estadía y me hicieron sentir parte del grupo de investigación; en especial a Lolis y Laura que con su amistad convirtieron a Xochitepec en una extensión de mi casa.

A toda la gente del herbario de la Facultad de Ciencias, Susana, Ramiro, Jaime y por supuesto a Mónica y Miriam, quienes me acercaron a la botánica e hicieron tan entretenido mi estancia durante el servicio social.

A mis amigos de la prepa: Ana, Mariana, Paula, Tania, Lucía, César, Ilán, Mauricio, José Luis, Roberto... por las reuniones, salidas y charlas que tantas veces tuvimos y seguiremos teniendo, con las cuales cargo pilas para seguir adelante con todos mis proyectos.

A mis amigos de la Facu: Karla, Silvia, Tania, Jimena, Miryam, Migueles, Yire, Javier, Adrián, Pablo, Arturo... porque de su amistad aprendí muchas cosas, en cada charla me ayudaron a guiarme en la carrera y la vida, estuvieron siempre al pendiente de todo lo que sucedía con éste y otros proyectos, porque sin todos ellos mi estadía en Ciencias nunca hubiera sido lo mismo.

A mis amigos del museo, sobre todo a Luz, Libertad y Jaque, que hacen tan grata la convivencia en el trabajo y me hacen sonreír hasta en el día más nublado.

A mi familia en Argentina y Japón que siempre han estado pendientes de mí y de mis proyectos, y que en cada carta o llamada telefónica me muestran su cariño haciendo desaparecer la distancia que nos separa.

A mi familia postiza, todos los amigos que fungen como abuelos, tíos y primos, que siempre están al tanto de cómo voy y se encargan de llenar los huecos que crean los kilómetros.

A todos los que de una u otra forma han estado cerca de mí y han hecho posible la realización de esta tesis.



## Índice

	Página
1. Resumen	1
1.1. Abstract	2
2. Introducción	3
3. Antecedentes	5
3.1. El uso de las plantas medicinales	5
3.2. Enfermedades crónico-degenerativas	8
3.2.1. Cáncer	8
3.2.2. Diabetes Mellitus tipo 2	10
3.3. Fármacos utilizados para el control de la Diabetes Mellitus tipo 2	13
3.4. Los inhibidores enzimáticos en las plantas	15
3.5. Fitoquímica de la familia Euphorbiaceae	16
3.6. Agentes citotóxicos e inhibidores de $\alpha$ -glucosidasas en la familia Euphorbiaceae	24
3.7. Taxonomía <i>Euphorbia dioeca</i> Kunth	26
4. Objetivos	30
5. Hipótesis	30
6. Método	31
6.1. Revisión de herbarios	31
6.1.1. Colecta del material	31
6.2. Estudio fitoquímico	31
6.2.1. Extracciones	31
6.2.2. Pruebas cualitativas para los principales grupos de metabolitos secundarios	33
6.2.3. Cuantificación de compuestos fenólicos	34
6.3. Estudio farmacológico	35
6.3.1. Pruebas de citotoxicidad en líneas celulares tumorales	35
6.3.2. Toxicidad aguda	38
6.3.3. Inhibición de $\alpha$ -glucosidasas <i>in vitro</i>	38
6.3.4. Inhibición de $\alpha$ -glucosidasas <i>in vivo</i>	41
6.3.4.1. Modelo experimental de diabetes mellitus tipo 2 en ratas macho cepa Long Evans	42
6.3.4.2. Ensayo de inhibición de $\alpha$ -glucosidasas <i>in vivo</i> : curva de tolerancia al almidón	43
6.4. Análisis estadístico	45
6.4.1. Diseño experimental	45
6.4.2. Modelo estadístico	46
6.4.3. Análisis e interpretación de la información	47
7. Resultados y discusión	48
7.1. Revisión de herbarios	48
7.1.1. Mapa de distribución y depósito de ejemplares botánicos	48
7.2. Estudio fitoquímico	51
7.2.1. Rendimiento de los extractos	51
7.2.2. Pruebas cualitativas para los principales grupos de metabolitos secundarios	51
7.2.3. Cuantificación de compuestos fenólicos	53

7.3. Estudio farmacológico	54
7.3.1. Pruebas de citotoxicidad	54
7.3.1.1. Línea celular tumoral de carcinoma de colon (COLON)	55
7.3.1.2. Línea celular tumoral de carcinoma nasofaríngeo (KB)	56
7.3.1.3. Línea celular tumoral de carcinoma de cervix (UIISO)	58
7.3.2. Toxicidad aguda	60
7.3.3. Inhibición de $\alpha$ -glucosidasas <i>in vitro</i>	61
7.3.3.1. Curva dosis - respuesta extracto metanólico	63
7.3.3.2. Curva dosis - respuesta extracto acuoso	64
7.3.4. Inhibición de $\alpha$ -glucosidasas <i>in vivo</i>	67
7.3.4.1. Informe del establecimiento del modelo experimental de diabetes mellitus tipo 2 en ratas macho cepa Long Evans	67
7.3.4.2. Ensayo de inhibición de $\alpha$ -glucosidasas <i>in vivo</i> : curva de tolerancia al almidón	68
8. Conclusiones	75
9. Bibliografía	76
10. Apéndice 1	86

## Índice de figuras y cuadros

	Página
Fig. 1 - Fotografía de <i>Euphorbia dioeca</i> Kunth.	29
Fig. 2 - Mapa de distribución <i>Euphorbia dioeca</i> Kunth.	29
Fig. 3 - Método de extracción del material biológico.	32
Fig. 4 - Prueba de citotoxicidad en líneas celulares tumorales con los extractos de <i>E. dioeca</i> .	37
Fig. 5 - Método seguido para evaluar la inhibición de $\alpha$ -glucosidasas <i>in vitro</i> de los extractos de <i>E. dioeca</i> .	40
Fig. 6 - Método seguido para obtener la curva dosis - respuesta de la inhibición de $\alpha$ -glucosidasas <i>in vitro</i> de los extractos de <i>E. dioeca</i> .	41
Fig. 7 - Protocolo para generar el modelo animal de Diabetes Mellitus tipo 2.	43
Fig. 8 - Prueba de inhibición de $\alpha$ -glucosidasas <i>in vivo</i> .	45
Fig. 9 - Distribución por Estado de los ejemplares de herbario de <i>Euphorbia dioeca</i> Kunth.	49
Fig. 10 - Ficha del ejemplar botánico de <i>Euphorbia dioeca</i> Kunth.	49
Fig. 11 - Mapa de distribución de <i>Euphorbia dioeca</i> Kunth.	50
Fig. 12 - Gráfica de cuantificación de compuestos fenólicos en los extractos metanólico, acuoso y diclorometánico de <i>E. dioeca</i> .	54
Figura 13 - Gráficas referentes a la prueba de citotoxicidad en línea celular tumoral de carcinoma de colon (COLON) con los extractos de <i>E. dioeca</i> .	56
Figura 14 - Gráficas referentes a la prueba de citotoxicidad en la línea celular de carcinoma nasofaríngeo (KB) con los extractos <i>E. dioeca</i> .	58
Figura 15 - Gráficas referentes a la prueba de citotoxicidad en línea celular tumoral de carcinoma de cervix (UIISO) con los extractos de <i>E. dioeca</i> .	59

<i>Figura 16</i> – Ensayo preliminar de inhibición de $\alpha$ -glucosidasas (0.2 mg/mL) con los extractos metanólico y acuoso de <i>E. dioeca</i> .	62
<i>Figura 17</i> – Curva dosis – respuesta del extracto metanólico de <i>E. dioeca</i> , en la inhibición de $\alpha$ -glucosidasas.	64
<i>Figura 18</i> – Curva dosis – respuesta del extracto acuoso de <i>E. dioeca</i> , en la inhibición de $\alpha$ -glucosidasas.	65
<i>Figura 19</i> – Curva dosis-respuesta de los extractos metanólico y acuoso de <i>E. dioeca</i>	66
<i>Figura 20</i> – Gráfica del porcentaje de inhibición de $\alpha$ -glucosidasas de los inhibidores conocidos: acarbosa y ácido tánico.	69
<i>Figura 21</i> – Gráfica de la inhibición de $\alpha$ -glucosidasas <i>in vivo</i> de los extractos metanólico y acuoso de <i>E. dioeca</i> , en un modelo de diabetes mellitus tipo 2 en rata cepa Long Evans.	70
<i>Cuadro 1</i> – Descripción de las soluciones A y B.	38
<i>Cuadro 2</i> – Rendimiento de los extractos de <i>E. dioeca</i> .	51
<i>Cuadro 3</i> – Prueba cualitativa de metabolitos secundarios de los extractos de <i>E. dioeca</i> .	52
<i>Cuadro 4</i> – Pruebas de citotoxicidad, ED <sub>50</sub> en las distintas líneas celulares.	55
<i>Cuadro 5</i> – Extracto metanólico, respuesta inhibitoria de $\alpha$ -glucosidasas a distintas concentraciones.	64
<i>Cuadro 6</i> – Extracto acuoso, respuesta inhibitoria de $\alpha$ -glucosidasas a distintas concentraciones.	65
<i>Cuadro 7</i> – Peso y glucemia inicial promedio de las ratas cepa Long Evans una semana después de la inyección de STZ.	67
<i>Cuadro 8</i> – Inhibición de $\alpha$ -glucosidasas <i>in vitro</i> , % de glucemia en sangre a lo largo de 120 min para cada tratamiento.	70

## 1. Resumen

El estudio de plantas medicinales dirigido a la generación de medicamentos herbarios de eficacia terapéutica confirmada científicamente (fitofármacos) para el control de las enfermedades crónico-degenerativas, como el cáncer y la diabetes mellitus tipo 2, es apremiante debido al escenario clínico mundial.

Se eligió *Euphorbia dioeca* Kunth que pertenece a la familia Euphorbiaceae, caracterizada por su diversidad fitoquímica, para desarrollar los estudios fitoquímico y farmacológico, utilizando los extractos hexánico, diclorometánico, metanólico y acuoso.

Se realizó un estudio fitoquímico para identificar los principales grupos de metabolitos secundarios y cuantificar los compuestos fenólicos presentes, siendo los extractos metanólico y acuoso los de mayor complejidad fitoquímica, detectándose una mayor concentración de compuestos fenólicos, entre los que destacan los flavonoides, fenoles y taninos.

Se hizo una prueba de citotoxicidad en líneas celulares tumorales, evaluando el efecto de los extractos en carcinoma nasofaríngeo (KB), carcinoma de colon (COLON) y carcinoma de cérvix (UISO), donde ninguno de los extractos de *E. dioeca* presentó un efecto citotóxico.

Los extractos metanólico y acuoso no produjeron alteraciones fisiológicas o conductuales al evaluarlos a través de la prueba de toxicidad aguda.

Los extractos metanólico y acuoso de *E. dioeca* presentaron altos porcentajes de inhibición de  $\alpha$ -glucosidasas *in vitro* en el ensayo a 2 mg/ml (78.5% y 56.7% respectivamente), evaluando homogenado de epitelio intestinal de rata (BBP); de la misma manera, la dosis efectiva para inhibir al 50% las  $\alpha$ -glucosidasas (ED<sub>50</sub>) fue baja (0.432 mg/ml para el extracto metanólico y 0.527 mg/ml para el extracto acuoso).

Por último, se realizó curva de tolerancia al almidón utilizando ratas cepa Long Evans diabetizadas, evaluando los extractos metanólico y acuoso, los cuales evitaron el incremento de glucosa en sangre después de su ingestión (picos hiperglicémicos posprandiales).

Los principios activos responsables de la actividad inhibitoria de  $\alpha$ -glucosidasas se encuentran posiblemente relacionados con la presencia de compuestos fenólicos. Con base en estos resultados se puede proponer a *E. dioeca* como una planta potencial en la elaboración de un fitofármaco para el control de la diabetes mellitus tipo 2.

## 1.1. Abstract

The study of medicinal plants aimed to phytopharmaceutical development for the treatment of chronic-degenerative diseases, as cancer and type 2 diabetes mellitus, is imperative due world's clinical background.

*Euphorbia dioeca* Kunth belongs to family Euphorbiaceae, characterized by their great phytochemical diversity, was chosen for develop a phytochemical and a pharmacological studies using the hexane, dichloromethane, methanol and aqueous extracts.

A phytochemical study was carried out for identify the secondary metabolites principal groups and quantify the phenolic compounds, being the methanolic and the aqueous the most phytochemically complex extracts, presenting flavonoids, phenols, tannins, and a greater concentration of phenolic compounds.

A cytotoxicity assay was performed in tumoral cell lines, evaluating nasopharyngeal carcinoma (KB), colon carcinoma (COLON) and cervical carcinoma (UISO), but none of the *E. dioeca* extracts displayed a cytotoxic effect.

Also, an acute toxicity test was achieved in where the methanolic and the aqueous extracts were reviewed, without observing any physiological or behavioral disturbance.

An alpha-glucosidase *in vitro* inhibition assay at 2 mg/ml was fulfilled using rat brush border particles (BBP), finding that the *E. dioeca* methanolic and the aqueous extracts exhibit a high enzymatic inhibition percentage (78.5% y 56.7% each one); also the 50% alpha-glucosidases inhibition standard dose (ED<sub>50</sub>) presented low values (0.432 mg/ml for methanolic extract and 0.527 mg/ml for aqueous extract)

Finally, a starch tolerance assay was performed using diabetic Long Evans rats, analyzing the methanolic and the aqueous extracts, resulting in an avoidance of postprandial hyperglycemia peaks.

The active principles responsible of the alpha-glucosidase inhibitory activity are probably related with the presence of phenolic compounds. With those results *E. dioeca* could be proposed as a potential plant for the development of a type 2 diabetes mellitus control phytopharmaceutical.

## 2. Introducción

Las plantas medicinales actualmente juegan un papel preponderante para la humanidad, ya que un gran porcentaje de la población recurre a la medicina tradicional para resolver sus problemas de salud (OMS, 2000).

Este escenario es muy común en los países en desarrollo, los cuales poseen un conocimiento milenario en el uso de plantas de carácter medicinal; tan solo nuestro país posee alrededor de 3352 especies de plantas medicinales (Linares, *et al.*, 1990).

No obstante todo éste conocimiento acumulado, la práctica de la medicina tradicional es constantemente relegada y se ha visto obligada a sobrevivir debido a las políticas gubernamentales en materia de salud, las cuales insisten en dar a la medicina alopática una prioridad absoluta, con la tendencia de reducir al mínimo el conocimiento tradicional.

Esta visión acerca del uso de plantas medicinales no es compartida por los países desarrollados, los cuales generan constante investigación farmacológica y producen medicamentos a partir de las plantas medicinales; ya sea para la extracción de compuestos activos, base de fármacos sintéticos, así como para generar fitofármacos (OMS, 2000).

El interés por el desarrollo de fitofármacos es creciente, ya que presenta una alternativa a los medicamentos alopáticos con una carga mucho menor de efectos secundarios. Los fitofármacos antigripales, para problemas digestivos y circulatorios son los más recetados, sin embargo existe un creciente interés en el desarrollo de fitofármacos que ayuden al control de las enfermedades crónico-degenerativas, ya que son la principal causa de mortalidad en los países industrializados (Cañigual y Vila, 2003; López-García, 2002).

En México, las enfermedades crónico-degenerativas tienen gran repercusión en la salud de la población, siendo el cáncer y la diabetes las principales causas de mortandad en el país (Secretaría de Salud, 2005). Este contexto hace apremiante la necesidad de buscar plantas medicinales que puedan ser fuente para el desarrollo de fitofármacos enfocados a dichos padecimientos.

Una manera de aproximarse a la búsqueda de plantas medicinales con potencial farmacológico son los estudios quimiotaxonómicos, encaminados a encontrar las familias botánicas de mayor complejidad fitoquímica, que poseen grupos de metabolitos

secundarios con actividad biológica, destinados generalmente a la defensa contra la herbivoría. Con base en lo anterior, se eligió a *E. dioeca*, una especie de la familia Euphorbiaceae, la cual se caracteriza por su gran diversidad fitoquímica (Rizk, 1987). *E. dioeca* es una especie ampliamente distribuida en México y se eligió para ser sometida a diversas pruebas fitoquímicas y farmacológicas enfocadas a la generación de un fitofármaco orientado al control de cáncer o diabetes.

Para el tratamiento de los carcinomas, se debe buscar un perfil citotóxico en los componentes fitoquímicos de la planta; mientras que en el caso del control de la diabetes, se debe investigar acerca de compuestos que presenten un efecto antidiabético. Uno de estos mecanismos son los inhibidores de enzimas intestinales, inhibidores de  $\alpha$ -glucosidasas, que disminuyen la digestión y absorción de glucosa, ayudando de esta forma, al control de la diabetes mellitus tipo 2. Es necesario entonces, conocer, de manera general, la composición fitoquímica de la planta, así como aplicar pruebas farmacológicas que nos permitan cuantificar la capacidad citotóxica e inhibidora de  $\alpha$ -glucosidasas de los extractos de *E. dioeca*, tanto en modelos farmacológicos *in vitro* como *in vivo*.

En este trabajo, se realizaron las pruebas fitoquímicas y farmacológicas pertinentes, aportando resultados que permitan proponer a *E. dioeca* como planta potencial en la elaboración de fitofármacos para el tratamiento de carcinomas y/o el control de la diabetes mellitus tipo 2.

### **3. Antecedentes**

#### **3.1. El uso de las plantas medicinales**

La relación con las plantas medicinales ha estado presente desde los primeros días de la humanidad, ya que conforman la base terapéutica en el control de la salud.

Dicho carácter continúa vigente hoy en día, sobre todo en países en desarrollo, donde un gran porcentaje de la población todavía depende de la medicina tradicional por lo que son un recurso importante para la atención primaria de la salud a través de su uso por los médicos tradicionales (OMS, 2000).

En 1978 la Declaración de Alma-Ata recomendó, entre otras cosas, la inclusión de medicinas tradicionales de utilidad comprobada en las políticas farmacéuticas y las medidas normativas nacionales (OMS, 2000). En esta misma asamblea se define la planta medicinal como cualquier planta que en uno o más de sus órganos contiene sustancias que pueden ser utilizadas con finalidad terapéutica o que son precursores para la semisíntesis químico-farmacéutica (Cañigual y Vila, 2003). Este hecho es de gran importancia, pues un organismo internacional reconoce la importancia del uso de los recursos vegetales con potencial terapéutico real.

La Asamblea Mundial de la Salud (WHA), en 1989, en su resolución WHA42.43, instó a los Estados Miembros a hacer una evaluación completa de sus sistemas de medicina tradicional, incluyendo estudios preclínicos y clínicos, con el fin de reglamentar y controlar los productos elaborados a partir de plantas medicinales, así como establecer y mantener estándares adecuados, incluyendo toda esa información en las farmacopeas nacionales.

En la Octava Conferencia Internacional sobre Autoridades Reguladoras de Medicamentos (ICDRA) celebrada en Bahrein en noviembre de 1996, se presentaron las 28 "Monografías de la OMS sobre Plantas Medicinales Seleccionadas", cuya función es proporcionar información científica sobre la inocuidad, eficacia y control de calidad de las plantas medicinales de uso generalizado; facilitar el uso adecuado de los medicamentos herbarios; proporcionar los modelos para que los Estados Miembros elaboren sus propias monografías sobre éstas y otros medicamentos herbarios adicionales y facilitar el intercambio de información. Actualmente se están preparando otras 32 monografías (OMS, 2000).



México ocupa el segundo lugar de plantas con uso medicinal representado por 3352 especies, antecedido por China con 5000 plantas medicinales (Linares, *et al.*, 1990), cifras referidas a los inventarios taxonómicos generales.

El vasto conocimiento en el uso de plantas medicinales en México es el reflejo del desarrollo que tuvieron las distintas culturas que habitaron el territorio mesoamericano. Dos de las zonas donde se acrecentó el conocimiento herbolario fueron la zona centro y la zona sur del territorio nacional (Guía México Desconocido: plantas medicinales, 2001).

La zona centro se caracteriza por ser, desde época prehispánica, un punto de fusión y encuentro intercultural. Debido a distintas razones políticas, económicas o meramente de expansión territorial, habitantes de diversas culturas mesoamericanas se concentraron en la región central; esto generó que se reuniera un gran número de especies medicinales de distintos lugares, pero que compartían usos terapéuticos similares. Además, la presencia de dos grandes centros culturales como Tenochtitlan y Teotihuacan, ayudaron a dispersar los conocimientos científicos por todos los territorios mesoamericanos.

La zona sur formaba el núcleo mesoamericano, siendo la cuna de grandes civilizaciones como la olmeca y la maya, las cuales poseían una cosmogonía que los relacionaba estrechamente con su medioambiente, generando así un profundo conocimiento de su flora, conocimiento que queda plasmado en textos como el "Chilam Balam" o el "Popol Vuh". Por si fuera poco, la zona sureste del país es la que concentra la mayor biodiversidad, producto de los complejos ecosistemas que allí existen, arrojando así una gama de recursos botánicos con fines terapéuticos.

Otro factor que facilitó contar con el conocimiento en herbolaria y medicina tradicional, son los trabajos de recopilación de información que se llevó a cabo en el periodo novohispano; entre los que destaca el código de Martín de la Cruz, traducido al latín por Juan Badiano "*Libellus de medicinalibus indorum herbis*" o "Código de la Cruz-Badiano", publicado en 1552, el cual describe métodos curativos con base en plantas, animales y algunos minerales utilizados por el médico indígena Martín de la Cruz, complementando dicho trabajo con ilustraciones de carácter botánico. También se encuentran las obras de Fray Bernardino de Sahún, que en 1557 da a conocer su obra "Código Florentino", versión náhuatl, o "Historia general de las cosas de la Nueva España", versión castellana, donde describe los nombres y usos múltiples de plantas medicinales y productos de origen animal utilizados por los indígenas para el

tratamiento de distintas enfermedades. Más tarde, en 1570, se encuentra la obra de Francisco Hernández, "Historia de las Plantas" donde se destaca el amplio conocimiento en el manejo de las plantas medicinales para el tratamiento y prevención de distintas enfermedades (Cortez-Gallardo, *et al.*, 2004).

En el caso de los países desarrollados, hacen investigación farmacológica y producen medicamentos a partir de las plantas medicinales; ya sea para la extracción de compuestos activos, base de fármacos sintéticos, así como para generar fitofármacos.

Un fitofármaco es un medicamento herbario generado a partir de una planta botánicamente definida, que generalmente es usada seca, fragmentada o en su totalidad, después de ser sujeta a un proceso de extracción, destilación, compresión, fraccionamiento, purificación, concentración y/o fermentación. El, o los compuestos activos son suministrados con la planta entera, nunca de manera aislada. Los fitofármacos tienen una estandarización fitoquímica y una caracterización farmacológica y toxicológica. Además se encuentran registrados bajo el rubro de medicamentos, en los organismos reguladores en materia farmacéutica, registro que debe corroborar cada cierto periodo de tiempo establecido. Se utiliza el fitofármaco para promover la salud, prevenir, atenuar o tratar un estado patológico. Si bien la fitomedicina puede presentar un tiempo de acción más largo que la medicina alópata, exhibe menos efectos secundarios (Cañigueral y Vila, 2003).

Los fitofármacos constituyen una parte importante en el mercado farmacéutico mundial, sobre todo en el caso de la Unión Europea; en 1991 el mercado de medicamentos herbarios alemán ascendió a US \$1.7 mil millones, mientras que en 1995 la cantidad total generada a partir de la venta de medicamentos herbarios llegó a US \$9 mil millones, encontrando así a los fitofármacos entre los 2000 medicamentos de mayor prescripción médica y con más de un 90% de la población utilizándolos (OMS, 2000). En toda Europa el valor global del mercado de los preparados a base de plantas medicinales alcanzó los US \$24 mil millones en el año 2002 (Cañigueral y Vila, 2003).

Un 66% de los alemanes utilizó en 1997 preparados de fitoterapia para combatir el resfriado, así como los trastornos gastrointestinales, el dolor de cabeza y el insomnio fueron padecimientos tratados con fitofármacos. En Francia, en cambio, el mercado está liderado por los productos para trastornos circulatorios (44%), seguidos por los digestivos, y los antitusivos y antigripales. En el caso de los Estados Unidos, las

alergias, el insomnio y los problemas respiratorios y digestivos constituyen el uso más frecuente de la fitoterapia (Cañigual y Vila, 2003).

Dentro de las enfermedades que también pueden ser tratadas o controladas a partir del uso de fitofármacos se encuentran las crónico-degenerativas, que debido a su creciente incidencia en la población mundial abre un panorama amplio a la investigación de plantas medicinales que puedan aunarse a la alternativa de la fitoterapia.

### **3.2. Enfermedades crónico-degenerativas**

Las enfermedades crónico-degenerativas son aquellas que van avanzando progresivamente hasta que terminan con la vida del paciente, sin que exista cura alguna para detenerlas. Las enfermedades crónico-degenerativas más comunes son la diabetes, el cáncer, la artritis, la enfermedad de Alzheimer y las enfermedades cardiovasculares, como la hipertensión arterial y la aterosclerosis (López-García, 2002).

Las enfermedades crónico-degenerativas son, actualmente, la principal causa de mortalidad en los países industrializados. En nuestro país, a partir de los 45 años se presenta la mayor tasa de incidencia, siendo entre 60 a 64 años el grupo de edad más afectado. En cuanto a los estados más afectados, encontramos a los estados de Campeche, el Distrito Federal, Nuevo León, Tamaulipas, Sinaloa, Baja California Sur, Durango y Chihuahua (Vigilancia epidemiológica, Secretaría de Salud, 2004).

Las enfermedades crónico-degenerativas comenzaron a presentarse con mayor incidencia conforme la esperanza de vida aumentó; sin embargo, existen actualmente casos, sobretodo de cáncer y diabetes, en niños y jóvenes. Factores como la contaminación ambiental, el consumo de alimentos altos en conservadores, grasas y carbohidratos, la vida sedentaria y la falta de horas de sueño, ha generado una mayor incidencia de estos padecimientos (López-García, 2002).

#### **3.2.1. Cáncer**

El cáncer ocurre por un descontrol y desdiferenciación en el crecimiento y tipo normal de las células. En los tejidos normales, las tasas relacionadas con el crecimiento de células nuevas y con la muerte de las células viejas se mantienen en balance. En el cáncer se altera este balance. Esta alteración puede ser el resultado del crecimiento

descontrolado de células o la incapacidad de las células a someterse a apoptosis. La apoptosis, o "el suicidio de las células", es el proceso en el cual las células viejas o dañadas se autodestruyen normalmente (National Cancer Institute, 2005).

En nuestro país, los tumores malignos ocupan el segundo lugar de mortalidad. "Como consecuencia de la transición epidemiológica y demográfica que vivimos, caracterizada por factores como el envejecimiento de la población y la adopción de hábitos poco saludables, la mayoría de los tumores malignos muestran una tendencia ascendente en el mundo, colocándose en el segundo lugar como causa de mortalidad en México, con el 12.7 por ciento del total de fallecimientos, sólo después de las enfermedades del corazón (15.9 por ciento)." (Secretaría de Salud, Comunicado de prensa No 25, 08 de Febrero de 2004).

Un aumento gradual en el número de células con capacidad para dividirse crea una masa creciente de tejido que se conoce como tumor o neoplasma. El tumor crecerá rápidamente de tamaño si la división de las células es relativamente rápida y no hay señales que provoquen la muerte de las células. Si las células se dividen más lentamente, el crecimiento del tumor será más lento. Sin importar la rapidez del crecimiento, los tumores crecen en tamaño porque las nuevas células se producen en cantidades mayores de lo que es necesario. La formación normal del tejido se alterará gradualmente, entre más y más se acumulen las células que se dividen. Los tumores se clasifican en benignos y malignos.

Los tumores benignos son tumores que sólo crecen localmente. Los tumores malignos son tumores que se pueden diseminar por invasión y por metástasis. Por definición, el término cáncer se aplica sólo a los tumores malignos.

Existen distintos tipos de cáncer según el tejido que atacan, así encontramos carcinomas (piel, mucosa, glándulas y órganos internos), leucemias (células sanguíneas), linfomas (nódulos y tejido linfático) y sarcomas (hueso, músculo y tejido conectivo).

El tratamiento en contra del cáncer consiste en cirugía, quimioterapia, radioterapia y otros métodos de tratamiento, como son el uso de inhibidores de la angiogénesis, trasplante de médula ósea y células troncales sanguíneas periféricas o terapia fotodinámica (National Cancer Institute, 2005).

### 3.2.2. Diabetes

La diabetes es un grupo de enfermedades metabólicas caracterizadas por niveles de glucosa altos en la sangre, hiperglucemia. Puede ser causada por defectos en la secreción de insulina, resistencia a la insulina o ambas. La hiperglucemia crónica está asociada con daños a largo plazo, disfunción y falla de varios órganos, especialmente en ojos, riñones, nervios, corazón y vasos sanguíneos.

Muchos procesos patogénicos están involucrados en el desarrollo de la diabetes. Éstos van desde la destrucción autoinmune de las células  $\beta$  pancreáticas, con su consecuente deficiencia de insulina, hasta anormalidades que generan resistencia a la insulina. La base de dichas anormalidades en el metabolismo de carbohidratos, grasas y proteínas en la diabetes, es la acción deficiente de la insulina en los tejidos blanco.

En la pre-diabetes se identifican problemas con la glucosa ingerida y/o problemas con la tolerancia a la glucosa, que son los que llevan a una situación de hiperglucemia.

Entre los síntomas de una marcada hiperglucemia se encuentran la poliuria, polidipsia, pérdida de peso, algunas veces con polifagia y la visión nublada (American Diabetes Association, 2006).

En nuestro país se ha convertido en la primera causa de mortandad; cada hora mueren cinco mexicanos por causa de esta enfermedad crónica-degenerativa, además el 70% de las personas con diabetes tienen formas moderadas o severas de daño neurológico, éstos últimos, puede llevar a amputaciones de las extremidades inferiores (Secretaría de Salud, Comunicado de prensa No. 628, 12 de Noviembre de 2005).

Se puede hablar tres grandes tipos de diabetes: diabetes mellitus tipo 1, diabetes mellitus tipo 2 y diabetes gestacional; aunque también existen otros tipos específicos de diabetes. Asignar un tipo u otro de diabetes a un individuo depende mucho de las circunstancias en el momento de la diagnosis, pues pueden presentar más de un tipo, o bien un tipo puede desencadenar en otro distinto (American Diabetes Association, 2006; Permut, *et al.*, 2005).

La diabetes mellitus tipo 1 es el resultado de la destrucción autoinmune de las células  $\beta$  productoras de insulina; dejando al paciente dependiente de inyecciones de la misma para sobrevivir. Esta forma de diabetes corresponde al 5 - 10% de los casos. Entre los marcadores de la destrucción inmune de las células  $\beta$  pancreáticas, se

encuentran, autoanticuerpos anti-islotos, autoanticuerpos a insulina, autoanticuerpos a descarboxilasa de ácido glutámico (GAD<sub>65</sub>) y autoanticuerpos a fosfatasa de tirosina IA-2 y IA-2β. La tasa de destrucción es variable en cada individuo (American Diabetes Association, 2006).

La diabetes mellitus tipo 2, también conocida como diabetes de la edad adulta, ocurre cuando la insulina pierde efectividad (insulinorresistencia), acompañada de una producción insuficiente de la misma por parte de las células β. Al menos en un principio, y frecuentemente a lo largo de su vida, los individuos que padecen diabetes mellitus tipo 2 no necesitan tratamiento con insulina para sobrevivir (American Diabetes Association, 2006; Permut, *et al.*, 2005; Davis y Granner, 2001). La diabetes mellitus tipo 2 comprende el 90 - 95% de los casos de diabetes.

La frecuencia de este tipo de diabetes está aumentando en todo el mundo de forma acelerada. Si en 1997 los datos de prevalencia se encontraban cerca de 124 millones de personas, actualmente estamos en 200 millones y se estima que en el año 2025 esta cifra llegará a más de 300 millones.

En este tipo de diabetes se producen trastornos metabólicos caracterizados por una hiperglucemia, dando lugar a complicaciones crónicas al afectar vasos y nervios. La alteración subyacente en esta enfermedad es la pérdida de sensibilidad de los tejidos a insulina, denominada insulinorresistencia, así como una secreción inadecuada de insulina, insulina defectuosa, por las células encargadas de su producción en el páncreas. Además de aumentar la concentración de glucosa, la acción deficiente de la insulina se traduce frecuentemente en elevación de los niveles de colesterol y/o triglicéridos (American Diabetes Association, 2006; Gómez Peralta, 2005).

La mayor parte de los casos de diabetes mellitus tipo 2 se producen en el contexto de lo que se llama Síndrome Metabólico. En este síndrome se asocian diabetes, hipertensión arterial, aumento de los niveles de colesterol, triglicéridos y/o ácido úrico así como sobrepeso, muy probablemente relacionados a la insulinorresistencia. El Síndrome Metabólico eleva notablemente el riesgo cardiovascular y es una causa fundamental de muerte en los países desarrollados.

La diabetes mellitus tipo 2 se da en una mayor tasa en personas con antecedentes familiares de diabetes. En los últimos años se han descubierto muchos genes relacionados con la posterior aparición de diabetes, aunque este componente genético es

complejo y, posiblemente, debe acompañarse de factores ambientales relacionados, en este caso, fundamentalmente con los hábitos de vida: sedentarismo y alimentación inadecuada. Sin embargo, la genética de esta forma de diabetes es compleja y no está claramente definida (American Diabetes Association, 2006; Permut, *et al.*, 2005).

El 80 % de las personas con diabetes tipo 2 son obesas, y la obesidad por sí misma causa cierto grado de resistencia a insulina. Pacientes que no son obesos, muchas veces tiene mayor cantidad de grasa corporal, distribuida predominantemente en la región abdominal (American Diabetes Association, 2006; Gómez-Peralta, 2005).

El tratamiento de la diabetes tipo 2 se basa en tres pilares fundamentales: seguimiento de un plan de alimentación equilibrado, práctica de ejercicio físico regular y tratamiento farmacológico personalizado.

La diabetes gestacional se define como cualquier grado de intolerancia a glucosa que comienza o se detecta por primera vez durante el embarazo, la cual suele incrementar la tendencia a desarrollar diabetes mellitus tipo 2. El deterioro en la tolerancia a glucosa durante el embarazo se presenta normalmente durante el tercer trimestre (American Diabetes Association, 2006).

También existen otros tipos específicos de diabetes: la relacionada a síndromes genéticos, síndrome de Prader-Willi, síndrome de Down, síndrome de Klinefelter, síndrome de Turner, síndrome de Wolfram, síndrome de Friedreich, síndrome de Lawrence-Moon-Biedl, corea de Huntington, distrofia miotónica; diabetes ocasionada por defectos genéticos en la función de las células  $\beta$ , como la diabetes juvenil de inicio durante la madurez (MODY), relacionados con los cromosomas 2 (*NeuroDI*), 7 (glucocinasas), 12 (factor de transcripción HNF-1 $\alpha$ ), 13 (factor 1 promotor de insulina, IPF-1), 17 (factor de transcripción HNF-1 $\beta$ ) y 20 (factor de transcripción HNF-4 $\alpha$ ); diabetes ocasionada por defectos genéticos en la acción de insulina, resistencia a insulina tipo A, síndrome de Rabson-Mendenhall, diabetes lipoatrófica; diabetes ocasionada por enfermedades en el páncreas exócrino, pancreatitis, pancreotomía, neoplasia, fibrosis quística, hemocromatosis, fibrocálculos pancreáticos; diabetes ocasionada por endocrinopatías, síndrome de Crushing, glucagonoma, fecromocitoma, hipertiroidismo, aldosteronoma; la diabetes postoperatoria; diabetes consecutiva a supresión inmunitaria, como anticuerpos a receptores anti-insulina; y diabetes relacionada con farmacoterapia, por fármacos como Vacor, pentamidinas, ácido nicotínico, glucocorticoides, hormonas

tiroídicas, inhibidores de proteasas retrovirales, antipsicóticos atípicos, agonistas  $\beta$ -adrenérgicos, tiazidas,  $\alpha$ -interferones (American Diabetes Association, 2006; Permut, *et al.*, 2005; Davis y Granner, 2001).

### 3.3. Fármacos utilizados para el control de la Diabetes Mellitus tipo 2

Los fármacos utilizados para el control de la diabetes mellitus tipo 2 se conocen bajo el nombre genérico de hipoglucemiantes orales. En contraste con los estudios sistemáticos que condujeron al aislamiento de la insulina, los hipoglucemiantes orales se descubrieron de manera accidental. Así en 1942, Janbon y colaboradores notaron que algunas sulfonamidas causaban hipoglucemia en animales de experimentación. A partir de dichas observaciones se fueron descubriendo más hipoglucemiantes que actúan a distinto nivel.

Entre los hipoglucemiantes orales encontramos a las sulfonilureas, las tiazolidinedionas, las biguanidas y los inhibidores de  $\alpha$ -glucosidasas.

Las sulfonilureas disminuyen las cifras de glucemia al estimular la liberación de insulina a partir de las células  $\beta$  pancreáticas. La administración aguda de sulfonilureas a pacientes con diabetes mellitus tipo 2, aumenta la liberación de insulina desde el páncreas. También pueden incrementar las cifras de insulinas al reducir la depuración de la hormona en el hígado. Entre las sulfonilureas más comunes encontramos la tolbutamida y la glibenclamida.

Las tiazolidinedionas son agonistas selectivos para el receptor gamma activado por proliferador de peroxisomas (PPAR $\gamma$ ) nuclear. Así, activan genes que tienen capacidad de dar respuesta a la insulina y regulan el metabolismo de carbohidratos y lípidos. Son sensibilizadores a la insulina, dando un aumento en la captación de glucosa en los músculos y decremento de la producción endógena de glucosa. Entre las tiazolidinedionas más comunes encontramos la troglitazona (retirada del mercado por estar vinculada a la toxicidad hepática), rosiglitazona y pioglitazona.

Las biguanidas poseen dos acciones principales, aumento de la sensibilidad de los tejidos muscular y adiposo a la acción de la insulina y la disminución de la gluconeogénesis, produciendo una disminución de la liberación hepática de glucosa. Se les considera un antihiperoglucemiante. Además, reduce la absorción intestinal de



glucosa. Reduce las lipoproteínas de baja y de muy baja densidad, llegando a producir una baja de peso en el paciente. Entre las biguanidas más conocidas encontramos a la metformina.

Por último, los inhibidores de las  $\alpha$ -glucosidasas reducen la digestión intestinal de almidón, dextrina y disacáridos al inhibir la acción de las  $\alpha$ -glucosidasas del epitelio intestinal. La inhibición de esta enzima aplaza la absorción de carbohidratos, por lo que el aumento posprandial de la glucosa plasmática disminuye en sujetos tanto normales como diabéticos. Entre los inhibidores de las  $\alpha$ -glucosidasas más comunes encontramos la acarbosa, un oligosacárido de origen microbiano, y el miglitol, un derivado de la desoxinojirimicina. También inhiben de manera competitiva a la glucoamilasa y a la sacarasa, pero tienen efectos débiles sobre la  $\alpha$ -amilasa pancreática. Los inhibidores de  $\alpha$ -glucosidasas reducen las concentraciones plasmáticas posprandiales de glucosa en sujetos tanto sanos como con diabetes mellitus tipo 1 y tipo 2. Los inhibidores de las  $\alpha$ -glucosidasas pueden tener profundos efectos sobre las concentraciones de hemoglobina A<sub>1</sub> en pacientes con diabetes mellitus tipo 2 que presentan hiperglucemia grave. De cualquier modo, en sujetos con hiperglucemia leve a moderada, el potencial de disminución de glucosa de los inhibidores de las  $\alpha$ -glucosidasas (valorado mediante las concentraciones de hemoglobina A<sub>1</sub>) es de alrededor de 30 a 50% con respecto al de otros antidiabéticos por vía oral. Los inhibidores de las  $\alpha$ -glucosidasas no estimulan la liberación de insulina; por lo tanto, no suscitan hipoglucemia (Davis, S. *et al*, 2001); sin embargo, causan mala absorción, flatulencia, diarrea y meteorismo abdominal vinculados con la dosis. La titulación lenta de la dosis del fármaco (25 mg al principio de una comida durante cuatro a ocho semanas, seguidos por aumentos a intervalos de cuatro a ocho semanas, hasta 75 mg antes de cada comida) reducirá los efectos secundarios gastrointestinales. Se administran dosis menores con refrigerios. En el caso de la acarbosa, ésta solamente funciona cuando se suministra antes de la comida (Bayer Pharmaceuticals, 2005). La acarbosa es más eficaz cuando se administra con una dieta con alto contenido de almidón y fibra, con restricción de glucosa y sacarosa (Davis y Granner, 2001). Si ocurre hipoglucemia cuando se utilizan inhibidores de las  $\alpha$ -glucosidasas con insulina o un secretagogo de esta última, debe administrarse glucosa más que sacarosa, almidón o maltosa.

La dieta promedio del mexicano tiene alto contenido en carbohidratos complejos, almidón de maíz principalmente, por lo que el suministro de inhibidores de  $\alpha$ -glucosidasas en pacientes con diabetes mellitus tipo 2, es una opción adecuada.

Las  $\alpha$ -glucosidasas son enzimas que se localizan en el epitelio intestinal y se encargan de catalizar la exohidrólisis de los enlaces 1,4-alfa-glucosídicos. Se han descrito, genética y bioquímicamente, al menos seis distintas  $\alpha$ -glucosidasas humanas que hidrolizan los enlaces  $\alpha$  de glucosa en carbohidratos simples y complejos. Dichas enzimas difieren con respecto a su especificidad por sustrato, condiciones óptimas de pH, peso molecular, sitio de expresión y localización en el cromosoma. Las distintas  $\alpha$ -glucosidasas son:  $\alpha$ -glucosidasa lisosomal ácida, de sucrasa-isomaltasa intestinal, de maltasa-glucoamilasa intestinal, la enzima glucosidasa II de la unidad catalítica del retículo endoplásmico, la glucosidasa I y la  $\alpha$ -glucosidasa C neutral. Exceptuando la glucosidasa I, todas comparten homología, ya que pertenecen a la misma familia genética (familia 31 de hidrolasas glicosiladas) (Hirschhorn, *et al.*, 2002).

### **3.4. Los inhibidores enzimáticos en las plantas**

En general, las plantas contienen cierto grado de resistencia contra la predación por parte de mamíferos, insectos, hongos y bacterias, la cual se refleja en el limitado número de predadores que pueden alimentarse de una determinada planta. Dicha resistencia es el resultado de un grupo de mecanismos que las plantas han ido adquiriendo durante su evolución.

Entre los compuestos de defensa de las plantas se encuentran antibióticos, alcaloides, terpenos, glucósidos cianogénicos y algunas proteínas. Dentro de esas proteínas están las quitinasas y las enzimas  $\beta$ -1,3 glucanasas, lectinas, argelinas, vicilinas, sisteminas e inhibidores enzimáticos.

Los inhibidores enzimáticos están divididos en varios tipos, inhibidores proteínicos, inhibidores no proteínicos, inhibidores tipo lectina, inhibidores tipo Knottin, inhibidores tipo Kunitz, inhibidores tipo thaumatina, inhibidores tipo  $\gamma$ -purotioninas e inhibidores de la familia de los cereales (Franco, 2002).

Los inhibidores de enzimas están presentes de múltiples formas en los tejidos vegetales (Melo, *et al.*, 1999). Entre ellos encontramos a los inhibidores de  $\alpha$ -

glucosidasas, los cuales inhiben, en mamíferos, a las enzimas intestinales encargadas de digerir los carbohidratos complejos y así convertirlos en monosacáridos absorbibles (Scheen, 2003). También están los inhibidores de  $\alpha$ -amilasa, los cuales encontramos en cereales y legumbres, e inhiben las  $\alpha$ -amilasas de distintas fuentes, tales como: la saliva humana, el páncreas de los mamíferos, algunos insectos, bacterias y hongos (Melo, *et al.*, 1999).

La  $\alpha$ -amilasa es la enzima que se encarga de catalizar la hidrólisis de los enlaces glucano, los cuales son componentes del almidón, glucógeno y otros carbohidratos. Muchos depredadores, sobre todo los insectos, se alimentan de semillas con altos contenidos de almidón durante su desarrollo en las etapas larvales y/o adultas, por lo que dependen de las  $\alpha$ -amilasas para sobrevivir. Los inhibidores de  $\alpha$ -amilasa presentes en algunas plantas, las protegen de dichos ataques y permiten así asegurar la integridad del material genético vegetal.

Dentro de los inhibidores enzimáticos no proteínicos, se encuentra a la acarbosa que funciona tanto como inhibidor de  $\alpha$ -amilasa como de  $\alpha$ -glucosidasas; se trata de un seudotetrasacárido, el cual posee un anillo de valienamina que es crucial en el mecanismo de inhibición de las enzimas amilolíticas; su estructura insaturada y conformación de media silla, actúa durante el proceso de hidrólisis de polisacáridos, inhibiendo competitivamente a las  $\alpha$ -glucosidasas.

Las propiedades de los inhibidores no proteínicos los convierten en objeto de estudio en el campo de la medicina, tanto para procedimientos de tratamiento como diagnósticos. La producción de acarbosa en las plantas es muy compleja y varias rutas metabólicas están involucradas (Franco, 2002).

Dentro de las familias botánicas que presentan respuesta a la herbivoría a partir de la secreción de metabolitos secundarios, entre los que encontramos a los inhibidores enzimáticos, está la familia Euphorbiaceae (Seigler, 1994).

### **3.5. Fitoquímica de la familia Euphorbiaceae**

Enfocando la necesidad de encontrar plantas medicinales que puedan generar fitofármacos para el tratamiento y control de enfermedades crónico-degenerativas, se eligió una especie perteneciente a la familia de las euforbiáceas: *Euphorbia dioeca* Kunth;

debido a que la fitoquímica de las Euphorbiaceae está entre las más diversas e interesantes de las familias de angiospermas y es comparable a la diversidad biológica de la familia. También se caracterizan por contener látex cáustico, lechoso o incoloro (Rizk, 1987). Debido a la presencia de inusuales metabolitos secundarios, muchas especies de euforbiáceas son venenosas o tóxicas (Seigler, 1994).

Algunas plantas de esta familia, especialmente aquellas del género *Euphorbia*, se caracterizan por la capacidad de inducir dermatitis (Evans, *et al.*, 1980). Otras han sido utilizadas en medicina tradicional, como pesticidas o como veneno para flechas. Muchas euforbiáceas son importantes como alimento, y otras tantas son de interés económico como plantas ornamentales y fuentes de gomas, precursores químicos, lubricantes y compuesto medicinales (Seigler, 1994).

El conocer la identidad fitoquímica de la familia Euphorbiaceae es también importante para determinar las relaciones quimiotaxonómicas (Bruneton, 2001; Seigler, 1994; Domínguez, 1973). Según la complejidad en las vías de producción de los metabolitos secundarios, pueden determinarse las relaciones taxonómicas y filogenéticas entre subgrupos y entre distintas familias botánicas; así, los géneros que presenten compuestos cuya producción está relacionada con vías más complejas de varios pasos, estarán más relacionados entre sí, al contrario de compuestos de vías simples y más comunes (Bruneton, 2001; Seigler, 1994; Rizk, 1987; Domínguez, 1973).

Miles de compuestos de distintas clases químicas han sido reportados en euforbiáceas (Seigler, 1994). Las principales clases de sustancias de interés para los fitoquímicos son triterpenoides, seguidos de flavonoides y alcaloides. Sin embargo, existen otras sustancias reportadas como cumarinas, glucosidos cianogénicos y taninos (Rizk, 1987).

A continuación se mencionan los principales grupos de metabolitos secundarios reportados para la familia Euphorbiaceae.

#### ✓ Alcaloides

Los alcaloides constituyen un grupo muy heterogéneo de bases vegetales nitrogenadas, producto del metabolismo de aminoácidos, con acción fisiológica más o menos intensa. Se encuentran bien representadas en las plantas, y van desde formas muy simples y usualmente bien distribuidas, hasta altamente complejas de distribución

restringida, en las euforbiáceas se encuentran ambos tipos. En particular se encuentran en especies de los géneros *Croton* y *Phyllanthus* (Seigler, 1994, Rizk, 1987, Domínguez, 1973).

Se les ha considerado como productos terminales del metabolismo del nitrógeno, y se les ha asociado con la protección ante actos predatorios, siendo tóxicos para estos comensales. A veces se encuentran en toda la planta, en una parte o bien, sólo están presentes en ciertas épocas del año o condiciones ecológicas (Bruneton, J. 2001).

Algunos tipos de alcaloides encontrados en la familia Euphorbiaceae son, alcaloides de imidazol, de pirimidina, de pirrolidina, de piridina, de piperidina, de quinolicidina, de quinazolona, de isoquinolina, de morfinandienona, de indol, de guanidina, diterpenoides, entre otros (Rizk, 1987).

#### ✓ Terpenos

Muchas plantas de la familia Euphorbiaceae poseen látex ricos en terpenos, metabolitos secundarios producto de la ruta del ácido mevalónico (Seigler, 1994, Domínguez, 1973).

Más de 55 triterpenoides (tetra y pentacíclicos) han sido identificados en la familia Euphorbiaceae. Han sido aislados del látex, así como de diferentes partes de la planta como corteza, córtex, flores, hojas, raíces y tallos. Alguno de los triterpenos ( $\alpha$ - y  $\beta$ -amyrin) ha sido encontrado tanto libre como en ésteres (acetatos) (Seigler, 1994, Rizk, 1987).

El mayor constituyente del látex de muchas especies de *Euphorbia* son triterpenos y sus ésteres; la cantidad presente fácilmente supera numéricamente a aquellos presentes en los demás géneros de la familia Euphorbiaceae. Monoésteres y diésteres también se encuentran en el látex de especies de *Euphorbia* pero sólo como componentes menores (Seigler, 1994, Rizk, 1987).

*Euphorbia fischeriana* Steud. es una planta utilizada en la medicina tradicional china debido a sus propiedades antitumorales, presentando derivados del campesterol, estigmasterol y sitosterol (Rizk, 1987).

El análisis de los aceites esenciales de varias especies de *Croton*, reportan distintos tipos de terpenoides, como monoterpenoides, fenilpropanoides y sesquiterpenoides (Seigler, 1994, Rizk, 1987).

Entre los triterpenos reportados en las euforbiáceas encontramos  $\beta$ -sitosterol,  $\alpha$ - y  $\beta$ -amyrina, traxerol, betulina, lupeol, cicloartenol, campesterol, estigmasterol, taraxerona, acetato de  $\beta$ -amyrina, taraxasterol, friedilina, ácidos oleanólico y ursólico, entre otros.

También una gran variedad de diterpenos se encuentran en la familia Euphorbiaceae. Entre éstos se encuentran los diterpenos cocarcinogénicos, los cuales presentan una fuerte actividad promotora de tumores, presentes en especies del género *Croton*, siendo el forbol uno de los principales representantes.

Otros diterpenos presentes en las euforbiáceas son los cíclicos provenientes del pirofosfato geranilgeranil, los derivados de kaureno y los altamente oxigenados (Seigler, 1994).

#### ✓ Flavonoides

Los flavonoides son pigmentos vegetales no nitrogenados que poseen un esqueleto carbonado; se conocen unos 200 flavonoides naturales los cuales se encuentran distribuidos solamente en las plantas (Domínguez, 1973).

Numerosos flavonoides han sido aislados y caracterizados de distintos miembros de la familia Euphorbiaceae, particularmente flavonas y flavonoles, aunque también encontramos flavononoles pero en menos plantas. Los flavonoides se encuentran en distintas partes de la plantas a excepción de las raíces. Los dos flavonoles más comunes son el camferol y la quercetina encontrándose distribuidos ampliamente en los distintos géneros de la familia (Rizk, 1987).

Se han aislado flavonoides de los géneros *Euphorbia*, *Ricinus*, *Ricinocarpos*, y *Beyeria*, entre otros (Seigler, 1994, Rizk, 1987).

Los flavonoides se caracterizan por tener importantes propiedades biológicas, la principal actividad atribuida a los flavonoides es la de ser venoactivos, disminuyendo la permeabilidad de los capilares sanguíneos y aumentando su resistencia, siendo así recomendados para el tratamiento de patologías circulatorias menores.

Por otro lado, los flavonoides también funcionan como compuestos antioxidantes al captar los radicales libres. También funcionan, *in vitro*, como inhibidores enzimáticos: la inhibición de la histidina descarboxilasa por el quercetol o la naringenina; la inhibición de la elastasa; la inhibición de la hialuronidasa, por flavonas y proantocianidoles; la

inhibición no específica de la catecol-O-metiltransferasa aumentando la resistencia vascular; la inhibición de la fosfodiesterasa del AMPc; inhibición de la aldosa reductasa y la inhibición de la proteincinasa. Raramente los flavonoides pueden estimular una actividad enzimática.

Otras propiedades de los flavonoides, entre ellos el cirsiriol y la hipolaeteina, son su actividad antiinflamatoria y antialérgica, ligadas con la capacidad de inhibir la 5-lipoxigenasa y por tanto la producción de los leucotrienos mediadores de la inflamación y de las manifestaciones alérgicas (Bruneton, 2001).

#### ✓ Glucósidos cianogénicos

Los glucósidos cianogénicos tienen un grupo nitrilo unido a un carbono que tiene incorporado, a su vez, un azúcar mediante un enlace glicosídico y dos grupos distintos que varían dependiendo de cual sea el glucósido. Al ser dañada mecánicamente por herbivoría, la planta libera ácido cianhídrico a partir de un proceso enzimático sobre los glucósidos (Domínguez, 1973).

Las plantas de las subfamilias Phyllanthoideae, Crotonoideae y Acalyphoideae, contienen glucósidos capaces de liberar cianuro a través de hidrólisis. Los géneros reportados como cianogénicos son: *Andrachne*, *Beyeria*, *Bridelia*, *Cnidoscolus*, *Colliguaja*, *Elateriospermum*, *Euphorbia*, *Gymnathes*, *Hevea*, *Jatropha*, *Manihot*, *Mercurialis*, *Phyllanthus*, *Poranthera*, *Securinega* y *Stillingia* (Seigler, 1994, Rizk, 1987).

Dentro de los glucósidos cianogénicos que producen las euforbiáceas se encuentran la acalyphina, linamarina, lotaustralina, marina, linustatina, taxifilina, phylantina y la trigloquinina entre otros (Seigler, 1994, Rizk, 1987).

#### ✓ Taninos

Los compuestos polifenólicos conocidos como taninos están especialmente distribuidos entre las plantas leñosas, pero también pueden encontrarse en especies herbáceas. Tanto los taninos hidrolizables como los condensados están presentes en plantas de la familia Euphorbiaceae (Seigler, 1994).

Taninos hidrolizables se han encontrado en géneros como *Euphorbia*, *Gleditsia*, *Mallotus*, *Phyllanthus* y *Sapium*. (Rizk, 1987). El ácido elágico se ha encontrado en varias

especies, mientras que los ácidos gálico y tánico se han identificado en *Euphorbia hirta* L. (Rizk, 1987).

Debido a que los taninos son estructuras complejas y en algunos casos parecen tener una distribución restringida, pueden ser compuestos útiles para cuestiones sistemáticas dentro de la familia (Seigler, 1994).

La mayor parte de las propiedades biológicas de los taninos se debe al poder que poseen de formar complejos con macromoléculas, especialmente proteínas. Así encontramos actividad terapéutica debidas a la astringencia, favoreciendo la regeneración de los tejidos, en caso de heridas superficiales o de quemaduras, impermeabilizando piel y mucosas por vía externa, y presentando un efecto antiséptico por vía interna. También cuentan con una actividad antioxidante, los taninos hidrolizables inhiben la peroxidación lipídica.

Al igual que los flavonoides, encontramos inhibición enzimática en varios casos, bloqueo de la 5-lipoxigenasa; inhibe la enzima convertidora de angiotensina, activan la hialuronidasa, que es la glucosiltransferasa de los microorganismos implicados en la cariogénesis; inhiben la proteínasa C, entre otros.

Algunos taninos elágicos se oponen al efecto mutagénico de ciertos cancerígenos y al trasplante de tumores experimentales. Se han llegado a describir efectos inhibidores de la replicación de los virus *in vitro* (Bruneton, 2001).

#### ✓ Cumarinas

Se trata de compuestos fenólicos, los cuales han sido aislados de pocas plantas; sin embargo, se trata de compuestos que se encuentran en distintas familias de plantas (Seigler, D.S., 1994, Rizk, A-F., 1987).

Las semillas de *Euphorbia lathyris* L. contienen dos bicoumarinas, euphobetina y isoeuphobetina. *Euphorbia royleana* Boiss. presentó benzocumarinas. Mientras que en *Mallotus japonicus* Müell. Arg. se identificaron bergeninas, compuesto que suele estar acompañado de ellagitáninas en las euforbiáceas (Seigler, 1994, Rizk, 1987).



✓ Quinonas

Se han encontrado shikoninas y acetilshikoninas en el tronco de *Jatropha glandulifera* Roxb., de *Acalypha indica* L., *Euphorbia pulcherrima* Willd. ex Klotzsch, se aislaron traquinonas, mientras que de *Hevea brasiliensis* Müell. Arg se obtuvieron ubiquinonas (Rizk, 1987).

✓ Ácidos fenólicos

Además del ácido elágico, gálico y tánico, otros ácidos fenólicos han sido identificados en plantas de la familia Euphorbiaceae. Así encontramos los ácidos veratríco y vanílicico, extraídos de *Euphorbia resinifera* O. Berg. Ácido clorogénico y neoclorogénicos obtenidos de *Ricinus communis* L. y *Mercurialis perennis* L. De *Euphorbia acanthothamnus* Heldr. & Sart. ex Boiss. se obtuvo ácido *p*-coumarico (Rizk, 1987).

✓ Ácidos grasos y lípidos

Un número inusual de ácidos grasos, saturados e insaturados, se encuentran como componentes primarios de los lípidos seminales de los miembros de la familia Euphorbiaceae, también se hallan de forma ocasional lípidos asociados con otras partes de la planta (Seigler, 1994, Rizk, 1987).

Destacan los géneros *Euphorbia*, *Sapium*, *Sebastiana*, *Croton*, *Ricinodendron*, *Alchornea*, entre otros. Presentando compuestos tales como el ácido decanoico,  $\alpha$ -eleosteárico, ricinoléico, epoxioléico, entre otros (Seigler, 1994, Rizk, 1987).

✓ Glucosinolatos

Los glucosinolatos en las Euphorbiaceae están confinados a un grupo pequeño, sólo en algunas especies se han identificado (Seigler, 1994, Rizk, 1987).

Las especies más importantes son *Drypetes gossweileri* S. Moore y *Putranjiva roxburghii* Wall.; de las cuales se obtienen la glucoputranjivina, la glucocochlearina, la glucojaputina y la glucoceomina entre los más destacados (Seigler, 1994, Rizk, 1987).

✓ Lignanos

Los lignanos se han identificado, a lo mucho, en sólo dos géneros de euforbiáceas: *Jatropha* y *Phyllanthus*. Las hojas de *Phyllanthus niruri* L., contienen phyllantina y hipophyllantina. *Jatropha gossypifolia* L., tiene en su tallo, raíz y semillas una butirólactona (Rizk, 1987).

✓ Aminoácidos

3,4-Dihidroxy-L-fenilalanina (L-dopa), un aminoácido no proteico usada para el tratamiento del mal de Parkinson, fue encontrado en varias plantas entre las que se encuentra *Euphorbia lathyris* L. (Seigler, 1994).

✓ Proteínas y péptidos

Las semillas de varios miembros de la familia Euphorbiaceae contienen proteínas tóxicas; el caso de *Ricinus comunis* L., el cual contiene proteínas antigénicas que aglutinan las células sanguíneas. Dos o cuatro semillas de dicha planta pueden ser letales, mientras que ocho son seguramente letales. Las semillas de *Aleurites fordii* Hemsl., *Jatropha curcas* L. y *J. multifida* L. también producen proteínas tóxicas que aún no han sido estudiadas (Seigler, 1994).

✓ Caucho/hule

Entre las Euphorbiaceae, el látex se encuentra en miembros de las subfamilias Crotonoideae y Euphorbioideae, pero generalmente está ausente en Phyllanthoideae, Oldfieldioideae, y Acalyphoideae. Si bien el látex es una mezcla compleja de diterpenos, triterpenos, enzimas, aminoácidos y otros compuestos, los compuestos isoprenoides poliméricos, son los más importantes. A partir de estos compuestos es que se tiene el caucho característico de las euforbiáceas (Seigler, 1994).

- ✓ Otros compuestos

Inhibidores de  $\alpha$ -glucosidasas como es el caso del  $\alpha$ -homonojirimicina derivado de *Omphalea diandra* L. (Seigler, 1994).

### 3.6. Agentes citotóxicos e inhibidores de $\alpha$ -glucosidasas en la familia Euphorbiaceae

Existen diversos estudios, tanto de etnobotánica como de farmacología y fitoquímica, en los cuales se analizan géneros de la familia Euphorbiaceae en la búsqueda de distintos agentes, tanto citotóxicos como inhibidores de  $\alpha$ -glucosidasas, entre dichos estudios destacan:

- ✓ Géneros y especies de la familia Euphorbiaceae en los cuales se encontraron agentes antitumorales o citotóxicos.
  - *Acalypha wilkesiana* Müll. Arg. generó apoptosis asociada a la generación de intermediarios de oxígeno reactivo y la liberación de citocinas pro inflamatorias, a partir de extractos de las semillas (Büssing, *et al.*, 1999).
  - *Aleurites fordii* Hemsl. contiene un éster de diterpeno que funciona como un promotor de tumores y por tanto un factor de cáncer en humano (Igarashi, 2000).
  - *Colliguaja integerrima* Gillies & Hook. presentó actividad citotóxica sobre líneas tumorales KB (carcinoma nasofaríngeo humano), a partir de los extractos de tallos, hojas y flores (Sequeiros, *et al.*, 2003).
  - *Colliguaja odorifera* Molina mostró actividad citotóxica sobre línea tumoral PS (leucemia linfocítica en ratón), a partir de los extractos de tallo y hojas (Sequeiros, *et al.*, 2003).
  - *Croton draco* Schltld. & Cham. tuvo actividad citotóxica *in vitro* e *in vivo* a partir del compuesto taspina (Tsacheva, *et al.*, 2004).
  - *Croton lechleri* Müll. Arg. desarrolló actividad citotóxica *in vitro* e *in vivo* a partir del compuesto taspina (Perdue, 1979).

- *Croton oblongifolius* Delile presentó un diterpeno con actividad citotóxica moderada para diversas líneas celulares tumorales (Roengsumran, *et al.*, 2001).
- *Croton palanostigma* Klotzsch tiene actividad citotóxica *in vitro* e *in vivo* a partir del compuesto taspina (Perdue, 1979).
- *Croton tiglium* L. el extracto acuoso posee ésteres forbólicos que presentan actividad anticarcinogénica en carcinoma en piel (Banerjee y Das, 2005).
- *Croton zambesicus* Müll. Arg. presentó diterpenos con actividad citotóxica extraídos de las hojas (Block, *et al.*, 2004).
- *Domohinea perrieri* Leandri mostró citotoxicidad en ensayos de escisión de cadena de ADN al evaluar los derivados de fenantreno (Long, *et al.*, 1997).
- *Euphorbia fischeriana* Steud. presenta derivados del campesterol, stigmasterol y sitosterol (Schoroeder, *et al.*, 1980).
- *Euphorbia kamerunica* Pax a partir de extractos etílicos de la resina del látex se encontraron fracciones con naturaleza citotóxica (Kio y Evans, 1981).
- *Euphorbia kansui* Liou ex S.B. Ho presentó diterpenos (kansuiforfina C y D) con propiedad citotóxica (De-Ji, *et al.*, 1991).
- *Euphorbia lactiflua* Phil. mostró actividad citotóxica en línea tumoral PS, a partir de extractos de tallo, hoja y flor (Sequeiros, *et al.*, 2003).
- *Euphorbia myrsinites* L. exhibió cuatro ésteres de diterpenos con características citotóxicas (Sevil, *et al.*, 1995).
- *Euphorbia poisonii* Pax. presentó actividad citotóxica en diterpenos ingólicos provenientes del látex (Majekodunmi, *et al.*, 1996).
- *Mallotus philippinensis* Airy Shaw se aislaron rottlerina, inhibidor selectivo de las PKC $\delta$ , efectivo contra varias líneas tumorales humanas (Ya-Fan, *et al.*, 2005).
- *Phyllanthus orbicularis* Kunth el extracto acuoso presentó tanto actividad citotóxica como antiviral (Del Barrio, 2000).
- *Phyllanthus piscatorum* Kunth tuvo citotoxicidad contra pruebas sistémicas *in vitro* con leucemia (Gertsch, *et al.*, 2004).
- *Phyllanthus urinaria* L. presenta extractos con actividad citotóxica y antiviral (Chien-Min, 2005).

- *Ricinus comunis* L. posee sustancias sumamente tóxicas y citotóxicas se extraen de esta euforbiácea (Wang, H.X., 2001).
  - *Sapium* sp. se encontraron ésteres de diterpenoides que tienen como función la activación de la proteína cinasa C (Aitken, A., 1987)
- ✓ Géneros y especies de la familia Euphorbiaceae en los cuales se encontraron agentes que funcionan como inhibidores de  $\alpha$ -glucosidasas
- *Euphorbia* en su variedad de especies fue analizada en búsqueda de inhibidores enzimáticos, entre éstos la  $\alpha$ -glucosidasas, encontrando nueve inhibidores de proteasas (Lynn, *et al.*, 1987).
  - *Euphorbia postrata* Ailton, se reporta actividad hipoglucemiante en la medicina tradicional mexicana, ligada a la infusión de hojas, encontrándose la presencia de flavonoides (Andrade-Cetto, A., 2005).
  - *Phyllanthus kurtziana*, se encontró actividad hipoglucemiante en los flavonoides aislados (Rao, *et al.*, 2005).
  - *Phyllanthus sellowianus* (Klotzsch) Müll. Arg. se localizó un efecto antidiabético y toxicidad aguda del extracto acuoso, corroborada en estudios *in vivo* en ratas diabetizadas con estreptozotocina (Hnatyszyn, *et al.*, 2002).
  - *Ricinus comunis* L. mostró una naturaleza inhibitoria de  $\alpha$ -glucosidasas y además una capacidad inhibitoria de la reversa transcriptasa del VIH-1 (Wang, H.X., 2001).

### 3.7. Taxonomía *Euphorbia dioeca* Kunth

La especie objeto de estudio *Euphorbia dioeca* Kunth, se consideraba recientemente como *Chamaesyce dioeca* (Kunth) Millsp.; esto es debido a que la taxonomía de la familia Euphorbiaceae es compleja. Distintas investigaciones que se han llevado a cabo, sobre todo las de carácter molecular, reordenan los géneros de la familia; así, los últimos análisis filogenéticos moleculares en la familia Euphorbiaceae *sensu stricto* usando plástidos RBCL y secuencias de DNA TRNL-F (genes localizados en el cloroplasto

de los organismos fotosintéticos, utilizados en estudios de cladística) (Wurdack, *et al.*, 2005) demostraron que dentro de la tribu Euphorbieae, no existe consenso suficiente para sostener al género *Chamaesyce* como un género distinto a *Euphorbia*, adhiriéndose así bajo el género *Euphorbia* a todos las especies de *Chamaesyce*.

Sin embargo, a nivel morfológico, hay claras diferencias que separan ambos géneros; *Chamaesyce* se distingue de *Euphorbia*, porque además del ciatio<sup>1</sup>, el cual tiene una sola flor pistilada en el género *Euphorbia* (Martínez-Gordillo, M. *et al.*, 2002) tiene hojas opuestas, asimétricas en la base y las estípulas frecuentemente interpeciolares.

En el caso específico de la especie objeto de estudio, *Euphorbia dioeca* Kunth, se utilizará la descripción taxonómica correspondiente a *Chamaesyce dioeca* (Kunth) Millsp. descrita por Standley en 1949 (Standley y Steyermark, 1949).

*Chamaesyce dioeca* (Kunth) Millsp., Publ. Field Columbian Mus. Bot. 2:10. 1914. *Euphorbia dioeca* Kunth, Nov. Gen & Sp. (quarto ed.) 2:53. 1817. Tipo: *Euphorbia bryophylla* Donn. Smith, Bot. Gaz. 56:62. 1913. Nombres vulgares: Golondrina (México, Guatemala), Ilama (Guatemala).

Plantas herbáceas, usualmente perennes, muy ramificadas desde la base, postradas y formando matas, la mayoría de 30 cm de largo o menos, los tallos densamente pilosos, con tricomas esparcidos, usualmente muy densamente foliados; estípulas tubuladas, pilosas; hojas opuestas, en pecíolos muy cortos, oblongas u ovado oblongas, 3 - 8 mm de largo, obtusas o subagudas, oblicuo-cordada en la base; involucros usualmente muy numerosos y densamente amontonados en las axilas de la hoja, rosa o rojos, piriformes-globosos, los lóbulos diminutos, lanceolados; glándulas impares, los apéndices conspicuos y parecidos a pétalos, desiguales, dos de los cuatro apéndices glandulares más largos que los otros; cápsula pubescente; semillas triangulares-ovoides, gris-rosa, 4 - sulcadas transversalmente (figura 1).

En México se encuentra distribuida en los estados de Campeche, Chiapas, Guerrero, Guanajuato, Hidalgo, Jalisco, Nayarit, Oaxaca, Querétaro, Quintana Roo, Veracruz y Yucatán; también se encuentra en Centroamérica (figura 2). Habita distintos tipos de vegetación: selva alta caducifolia, selva alta perennifolia, selva mediana subperennifolia, bosque de pino - encino, bosque de pino, matorral, dunas costeras, sabana, pastizal, chaparral.

El caso de *Euphorbia (Chamaesyce) dioeca* Kunth, no sólo existe discusión a nivel de

---

<sup>1</sup> Ciantio.- tipo de inflorescencia característico de *Euphorbia* y *Chamaesyce*, las flores unisexuales agrupadas y condensadas dentro de un envoltura bracteal de la cual emergen en la antesis, constituyendo un seudantio.

género, también en lo referente a la especie, por lo que pueden encontrarse contradicciones entre el nombre aceptado y las sinonimias según la fuente que se consulte. La confusión reside en si se denomina “*dioeca*” o “*dioica*”.

Kunth, en *Nova Genera et Species Plantarum* (cuarto ed.) 2:53, año de 1817, propone el nombre *Euphorbia dioeca* a un ejemplar colectado por Humboldt y Bonpland en Venezuela; en la descripción botánica asumían que la planta era dioica, pues sólo encuentran flores estaminadas en el espécimen, pero pensando que pudieran examinar la planta viva, el tema de los ciantios unisexuales podría ser investigado a profundidad (McVaugh, 1993). Desde 1817 el nombre ha sido mencionado por varios autores, la mayor parte de forma incidental, cambió la escritura del epíteto a “*dioica*”, el cual se conservó durante muchos años.

Fue hasta 1914, cuando Millspaugh retomó esta problemática y volvió al nombre más antiguo, dado por Kunth, pero además incluyó a la planta bajo el género *Chamaesyce*, y separó a otras cuatro especies que se consideraban sinonimias de *E. dioeca*, como fueron *C. adenoptera* (Bertol.) Small, *C. inaequalis* (Klotzsch & Garcke) Millsp. y *C. indivisa* (Engelm.) Millsp.. Según la descripción de Millspaugh, *C. dioeca* Kunth era la única de entre esas especies que tiene tricomas unicelulares en los tallos y presumiblemente en las hojas (McVaugh, 1993).

Como se mencionó en un principio, actualmente se está proponiendo que se elimine el género *Chamaesyce* y que todas sus especies se incluyeran en el género *Euphorbia*, según los estudios filogenéticos más recientes (Wurdack, K.J. *et al*, 2005).



Fig. 1 - Fotografía de *Euphorbia dioeca* Kunth



Fig. 2 - Mapa de distribución *Euphorbia dioeca* Kunth. Missouri Botanical Garden, 2005.



## Objetivos

### ➤ **Objetivo general:**

- Aportar resultados que permitan proponer a *Euphorbia dioeca* Kunth, como planta potencial en la elaboración de fitofármacos para el tratamiento de carcinomas y control de la diabetes mellitus tipo 2

### ➤ **Objetivos particulares:**

- Identificar en *Euphorbia dioeca* Kunth los principales grupos de metabolitos secundarios presentes.
- Evaluar en *Euphorbia dioeca* Kunth la actividad citotóxica e inhibidora de  $\alpha$ -glucosidasas.

## 5. Hipótesis

Debido a las características fitoquímicas de la familia Euphorbiaceae, *Euphorbia dioeca* Kunth es una planta con potencial farmacológico:

- ▶ Por una parte, si presenta compuestos de característica citotóxica, podrá afectar el crecimiento de líneas celulares tumorales evaluadas, pudiendo ser de utilidad en el tratamiento del cáncer.
- ▶ Por otro lado, si presenta compuestos relacionados con la inhibición de  $\alpha$ -glucosidasas, podrá evitar los picos posprandiales de glucosa presentes en pacientes con diabetes mellitus tipo 2.

## 6. Método

### 6.1. Revisión de herbarios

Con la finalidad de encontrar más información referente a la localización y usos de *Euphorbia dioeca* Kunth, y para generar un mapa de distribución y definir un sitio de colecta del material, se revisaron los siguientes herbarios:

- ✎ Herbario Nacional, Universidad Nacional Autónoma de México (MEXU).
  
- ✎ Herbario de la Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México (FCME).
  
- ✎ Herbario de la Escuela de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional (ENCB).
  
- ✎ Herbario del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSSM).

#### 6.1.1. Colecta de material

En el mes de agosto de 2004, se llevó a cabo la colecta del material biológico. En la localidad de Playa la Trocha, municipio de Alvarado, Veracruz (18° 47' 17.5''N, 95° 45' 17.5'' W); se recolectó aproximadamente 1 kg de material fresco. Dicho material se dejó secar a la sombra, en un lugar fresco y ventilado. Una vez seco el material se usó para realizar las extracciones.

## 6.2. Estudio fitoquímico

### 6.2.1. Extracciones

Del material seco se eligió la parte aérea de la planta y se molió con un molino de granos convencional y posteriormente se sometió al proceso de extracción.

Se realizaron extracciones en Soxhlet, con solventes orgánicos de distinta polaridad; hexano, diclorometano y metanol; se efectuaron tres extracciones de ocho horas cada una, para cada uno de los solventes utilizados.

Se obtuvieron los extractos hexánico, diclorometánico y metanólico; se llevaron a sequedad utilizando un rotavapor; cada uno de los extractos fue sometido a una desecación absoluta utilizando una liofilizadora.

Para el extracto acuoso se llevó a cabo una infusión, colocando el material seco en agua hirviendo y se dejó macerar durante 24 horas y posteriormente se filtró y se desecó en la liofilizadora (Figura 3).

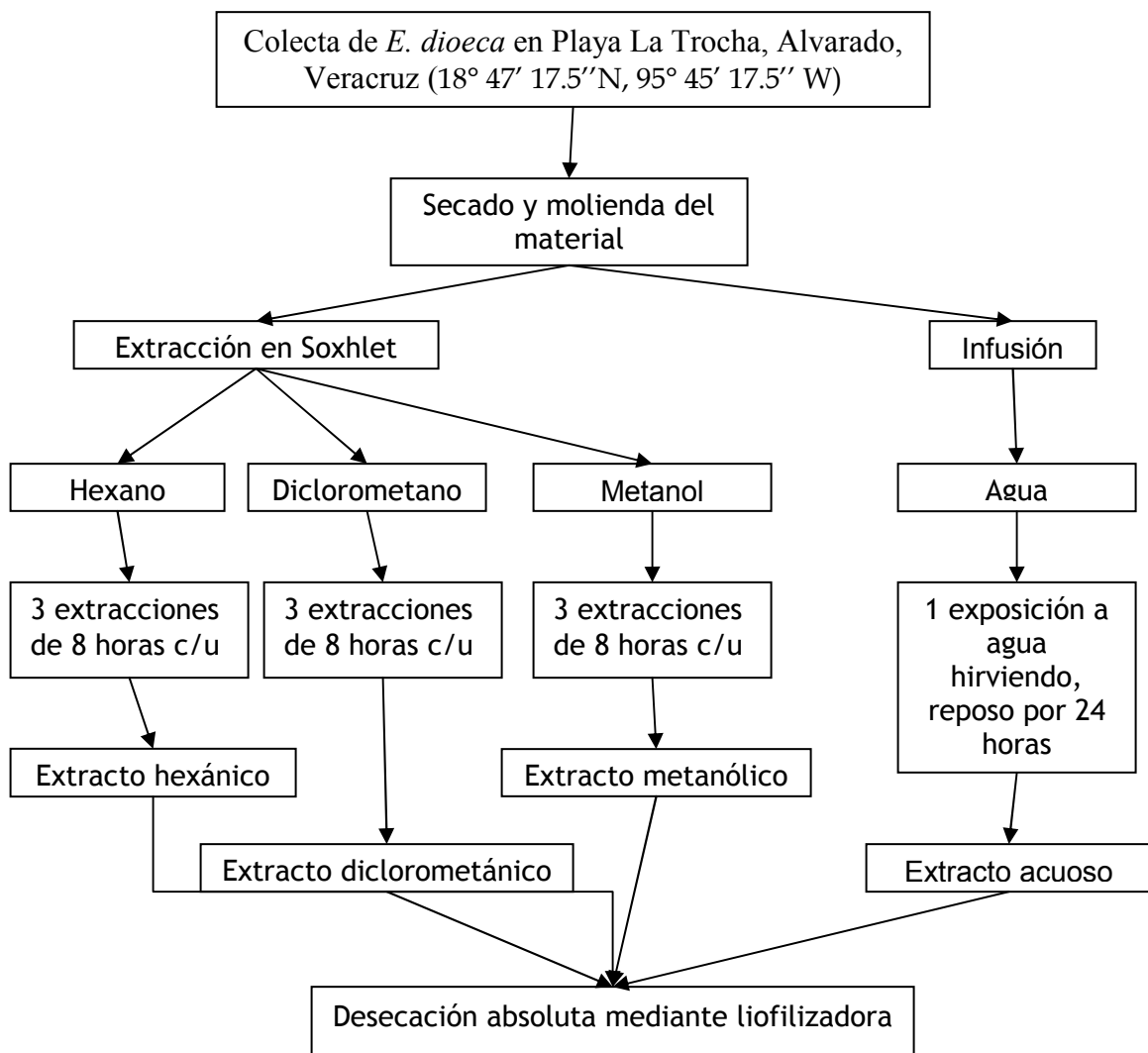


Fig. 3 - Método de extracción del material biológico

### 6.2.2. Pruebas cualitativas para los principales grupos de metabolitos secundarios

Con los extractos obtenidos se realizaron las pruebas cualitativas para identificar los grupos principales de metabolitos secundarios, bajo los métodos de investigación fitoquímica citados por Domínguez en 1973. Esto se llevó a cabo en el Laboratorio de Fitoquímica, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México.

#### ✎ Terpenos

Se mezclaron volúmenes iguales de anhídrido acético y cloroformo, se enfrió la mezcla en hielo y se agregaron tantas gotas de ácido sulfúrico como mililitros de cloroformo contenidos en la mezcla.

A 1 ml de extracto disuelto en cloroformo (solución madre), se agregó 1 ml del reactivo.

Se considera una reacción positiva, con presencia de terpenos, cuando se observa un cambio a distintas intensidades de verde.

#### ✎ Glucósidos (Prueba de Mölish)

A 1 ml de extracto se agregaron 2 gotas de una solución de  $\alpha$ -naftol en etanol al 5% y 1 ml de ácido sulfúrico concentrado, dejándolo resbalar por las paredes del tubo de ensayo poco a poco, de tal manera que el ácido y la solución metabólica se estratifiquen.

De ser positiva la reacción, se formará un anillo violeta en la interfase; de ser negativa, se formará un anillo café en la interfase.

#### ✎ Alcaloides (Prueba de Dragendorff)

A 1 ml de extracto se adicionó 1 ml de ácido clorhídrico al 1% más 2 gotas del reactivo de Dragendorff.

Una reacción positiva formará un precipitado naranja.

#### ✎ Alcaloides (Prueba con ácido silicotúngstico)

Se disolvieron 5 g del ácido silicotúngstico en ácido sulfúrico 6 N, dicha disolución es la necesaria para formar 6 ml de solución del extracto.

Una reacción positiva formará un precipitado.

#### ✎ Flavonoides (Prueba de Shinoda)

A 1 ml de extracto se le agregó un trozo de tira de magnesio y 2 gotas de ácido clorhídrico concentrado. Se formarán burbujas alrededor de la tira de magnesio y se presentará un cambio de color.

La reacción será positiva si se presenta un color naranja, rojo, azul o violeta.

#### ✎ Fenoles

A 1 ml de extracto se agregaron tres gotas de cloruro férrico al 1% disuelto en etanol.

La prueba será positiva si dicha disolución cambia de un color naranja a uno azul verdoso.

#### ✎ Taninos

A tres tubos de ensayo se le agregaron 0.5 ml del extracto; al primero se le agregaron 0.5 ml de cloruro de sodio al 0.85%; al segundo se le agregaron 0.5 ml de solución de gelatina al 1%; y al tercero se le agregaron 0.5 ml del reactivo de gelatina - sal.

El reactivo de gelatina - sal se preparó mezclando 1 ml de gelatina al 1% más 1 ml de solución de cloruro de sodio al 0.85% y se tomó 0.5 ml para las pruebas.

La reacción será positiva si se observa precipitado en los tubos a los que se les agregó gelatina y gelatina - sal; de obtenerse precipitado sólo con el tubo de cloruro de sodio la prueba se considera negativa.

### **6.2.3. Cuantificación de compuestos fenólicos**

La determinación cuantitativa de compuestos fenólicos se llevó a cabo en los extractos metanólico, diclorometánico y acuoso.

Se realizó una disolución de cada uno de los extractos a una concentración de 4 mg/ml y se prepararon dos disoluciones, 1:10 y 1:50, cada una de estas tres diluciones, también expresadas como 100%, 10% y 2%, se sometieron a la reacción de determinación de compuestos fenólicos.

La reacción consistió en agregar 200  $\mu$ L de reactivo de Folin a las diluciones, y esperar a que reaccionara durante 10 minutos. Posteriormente se agregó solución de

carbonatos (solución A), de determinación de proteínas y se dejó reaccionar durante 1 hora; todas las reacciones se efectuaron en la oscuridad.

Finalmente se leyeron en el espectrofotómetro a 725 nm, y se graficó la concentración de extracto contra la concentración de compuestos fenólicos obtenida.

Los resultados se compararon con una curva patrón de ácido tánico, en concentraciones de 0, 15, 45 y 120 µg/ml, para así conocer la cantidad de compuestos fenólicos (equivalentes µg/ml de ácido tánico) presentes en los distintos extractos.

### **6.3. Estudio farmacológico**

#### **6.3.1. Prueba de citotoxicidad en líneas celulares tumorales**

La prueba de citotoxicidad en líneas celulares tumorales, se llevó a cabo según el protocolo del Instituto Nacional del Cáncer (NCI) de evaluación del potencial citotóxico y habilidad para inhibir la biosíntesis de macromoléculas, descrito por Swanson y Pezzuto en 1986.

Las pruebas se realizaron en el Laboratorio de Biología Celular, Centro de Investigación Biomédica del Sur (CIBIS - IMSS), ubicado en Xochitepec, Morelos.

Se evaluó el efecto de los extractos de *E. dioeca* Kunth en las líneas celulares tumorales de carcinoma nasofaríngeo (KB), carcinoma de colon (COLON) y carcinoma de cérvix (UISO) (Figura 4).

Las líneas celulares tumorales se mantuvieron en una solución de suero fetal bovino al 10%. Los cultivos se incubaron a 37° C en una atmósfera con 5% de CO<sub>2</sub> disuelto en aire con una humedad del 100%. Dentro de un periodo de 72 a 96 horas las células crecieron de una concentración de 5 x 10<sup>4</sup> células/ml a una de 70 - 80 x 10<sup>4</sup> células/ml, cumpliendo las tres fases del crecimiento celular: fase latente breve, fase logarítmica y la fase de meseta o estacionaria. Al alcanzar la concentración final, se tomaron alícuotas del cultivo y se resuspendieron en nuevo medio, asegurando así que las líneas celulares tumorales nunca lleguen a la fase de declive (Swanson y Pezzuto, 1986).

Para el análisis de citotoxicidad se parte de una disolución de 20 mg/ml de los distintos extractos (hexano, diclorometano, metanol y acuoso), en una mezcla 1:1 de

agua y dimetilsulfóxido (DMSO); posteriormente se realizaron tres diluciones a 100, 10 y 1 µg/ml, concentración final en medio de cultivo.

Cada una de las concentraciones de extracto se colocaron por triplicado en tubos de poliestileno de 12 ml, agregando 2.85 ml de células tumorales en suspensión a una concentración de  $5 \times 10^4$ /ml. El cultivo de líneas celulares tumorales se mantuvo en fase latente breve, verificando el número celular adecuado, eliminando las células muertas a través de enjuagues con medio PBS y poniendo en suspensión las células vivas en nuevo medio. Por otro lado se prepararon tubos control sin extracto y otros en los cuales se eliminó el medio y se dejaron solamente las células para verificar la concentración celular inicial o tiempo inicial.

Todos los tubos con extracto y los controles se incubaron por 72 horas en las mismas condiciones en las que se mantuvieron los cultivos celulares. Transcurrido el tiempo de incubación se sacaron los tubos, se eliminaron las células muertas a través de enjuagues y se dejaron escurrir totalmente los tubos.

Se preparó la solución para la determinación de proteínas, con una solución 50:1 de solución A y B (Cuadro 1). Se colocaron en cada tubo 6 ml de dicho reactivo, se agitó y se esperó 10 minutos. Posteriormente se agregaron 200 µL de reactivo de Folin y se volvió a agitar, se dejó en la oscuridad durante 30 minutos para que desarrolle la reacción, marcada por un cambio de coloración de rosado a azul.

Una vez desarrollado el color se leyó a 660 nm. Para considerar que un compuesto es citotóxico y posee capacidad inhibitoria de biosíntesis de macromoléculas, se busca que la dosis necesaria para reducir al 50% el crecimiento celular ( $ED_{50}$ ) sea  $\leq 20$  µg/ml de extracto; de no ser así, no se considera una sustancia citotóxica (Swanson, S.M., Pezzuto, J.M., 1986).



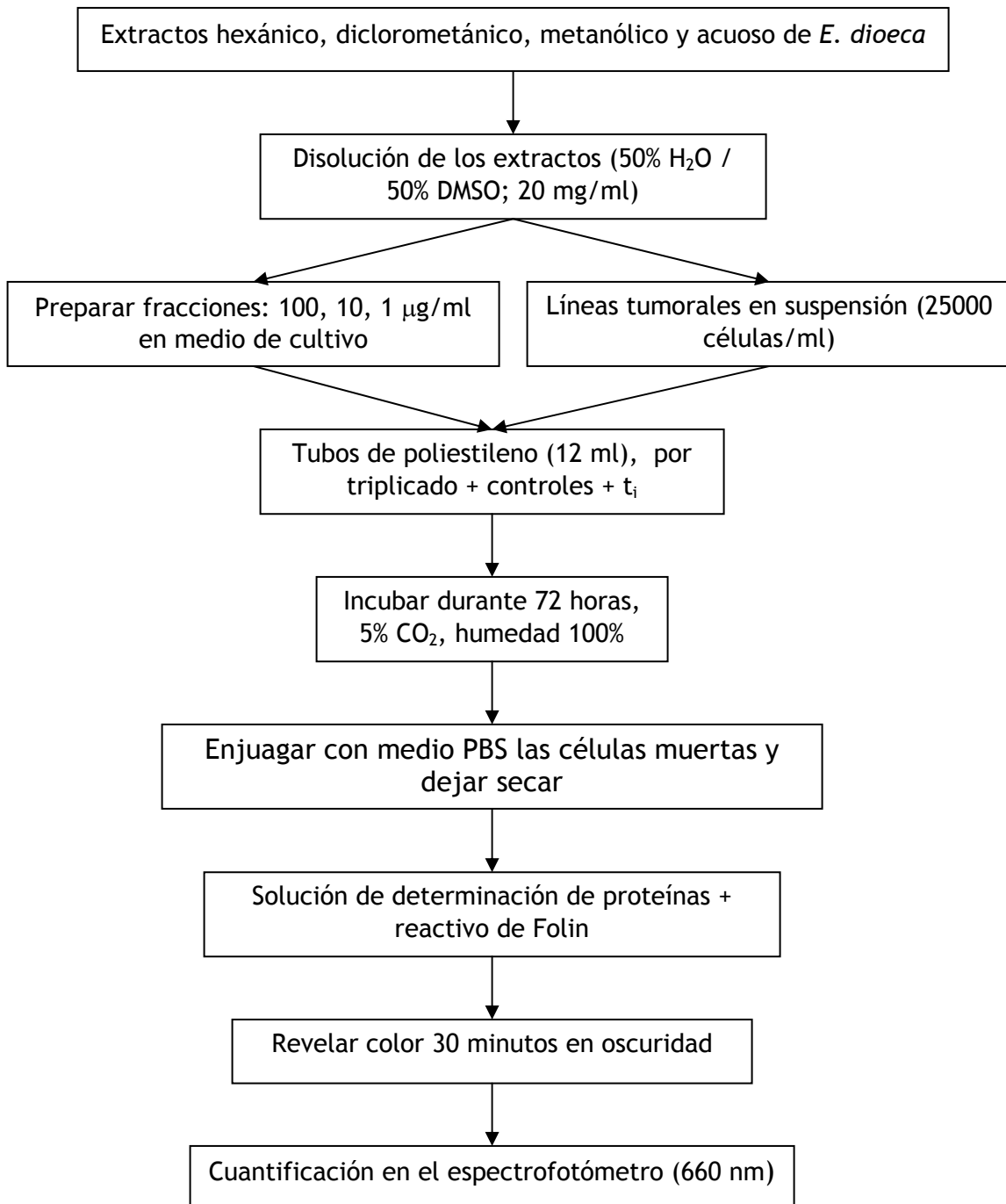


Fig. 4 - Prueba de citotoxicidad en líneas celulares tumorales con los extractos de *E. dioeca*

Cuadro 1. Descripción de las soluciones A y B

Solución A:	6.3.1. 20 g. Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> 6.3.2. 4 g. NaOH 6.3.3. 0.2 g. tartrato de NaK 6.3.4. 1 L. H <sub>2</sub> O
Solución B:	6.3.5. 2.5 g. CuSO <sub>4</sub> . 5 H <sub>2</sub> O 6.3.6. 0.5 L. H <sub>2</sub> O

### 6.3.2. Toxicidad aguda

La prueba de toxicidad aguda se llevó a cabo en las instalaciones del CIBIS, IMSS, de acuerdo al protocolo 423 de la OECD (OECD, 2000).

Se utilizaron seis ratones cepa Balb-C, y se les dio una concentración de 6 g de extracto por kilogramo de peso del animal. Se suministró el extracto disuelto en agua vía oral, a través de una sonda orogástrica (cánula).

Dicha dosis de extracto (6 g/Kg) está contemplada a los estándares internacionales de toxicidad, justificando la ausencia de un gran número de animales al intercambiarla por una dosis alta que estadísticamente corrobora la toxicidad.

Los ratones se observaron en el momento de la ingestión de los extractos, durante la primera hora, a las seis horas, las doce horas, las veinticuatro horas y a los 15 días; en todo tiempo se verificó cualquier reacción adversa fisiológica y conductual.

### 6.3.3. Inhibición de $\alpha$ -glucosidasas *in vitro*

El ensayo de inhibición de  $\alpha$ -glucosidasas *in vitro* (Tapia, 2006) se llevó a cabo en el CIBIS, IMSS.

Se realizaron pruebas de inhibición de  $\alpha$ -glucosidasas *in vitro*, para conocer si *Euphorbia dioeca* tenía alguna actividad inhibitoria enzimática, que pudiera ser de interés en el tratamiento de la diabetes tipo 2. La prueba preliminar se hizo a una concentración de 2 mg/ml, probando los extractos diclorometánico, metanólico y acuoso (Figura 5).

La prueba consistió en comparar la actividad enzimática presente en una preparación de partículas de epitelio intestinal (BBP) en ausencia y presencia de los

extractos empleando como sustrato almidón de maíz (S-4126, Sigma) a una concentración de 12.5 mg/ml.

Se prepararon cinco reacciones por triplicado: control (sin extracto), extracto diclorometánico, extracto metanólico, extracto acuoso y un extracto con actividad inhibitoria conocida (extracto acuoso de *Tecoma stans* (L.) Juss. ex Kunth).

Cada tubo se preparó con 100 µl de buffer pH 7.0 de fosfatos 0.2M, 100 µl de almidón, 40 µl de extracto y 10 µl de BBP. En el lote sin inhibidor se sustituyó el volumen de extracto por agua bidestilada.

Al agregar las BBP se incubaron en los tubos a 37 °C durante 10 minutos, con la finalidad de que las  $\alpha$ -glucosidasas presentes en las BBP comenzaron a degradar el almidón. Una vez transcurrido el tiempo se detuvo la reacción con 2.5 µL de acarbosa y la colocación en hielo de los tubos de ensaye.

Al terminar la reacción en todos los tubos, se tomaron 2.5 µl de muestra y se vierte por triplicado en una placa de 96 pozos, conservando un pozo en blanco, un pozo con 2.5 µl de estándar de glucosa y otro con 5 µl de estándar de glucosa, para conocer el mínimo y el máximo contenido de glucosa que se puede llegar a presentar. A cada uno de los pozos se le agregaron 250 µl de reactivo de determinación de glucosa en sangre, suero y plasma (marca Randox) y se mantuvo la placa durante 10 minutos a 37°C para que se desencadenara la reacción. Dicha reacción está basada en la oxidación enzimática de la glucosa oxidasa. El peróxido de hidrógeno formado reacciona, bajo la catálisis de peroxidasa con el fenol y la 4-aminofenazona. Debido a la quinonemina, colorante usado como indicador, la concentración de glucosa tornará de un color amarillo a uno rojo violáceo, de manera proporcional a la cantidad de glucosa.

La absorbancia de las muestras se cuantificó en un lector de microplacas a 492 nm, restándole la absorbancia a 630 nm, para evitar interferencia de turbidez y color de los extractos.

Una vez encontrados los extractos más activos, se realizó una curva dosis - respuesta, con el fin de caracterizarlos farmacológicamente.

La curva dosis - respuesta se desarrolló mediante el método previamente descrito, pero cada extracto se evaluó en a diferentes concentraciones: 16, 4, 1.6, 0.4, 0.16, 0.08 y 0 mg/ml, lo que permite conocer la actividad inhibitoria máxima y mínima del extracto. Éste experimento se realizó por cuadruplicado (Figura 6).

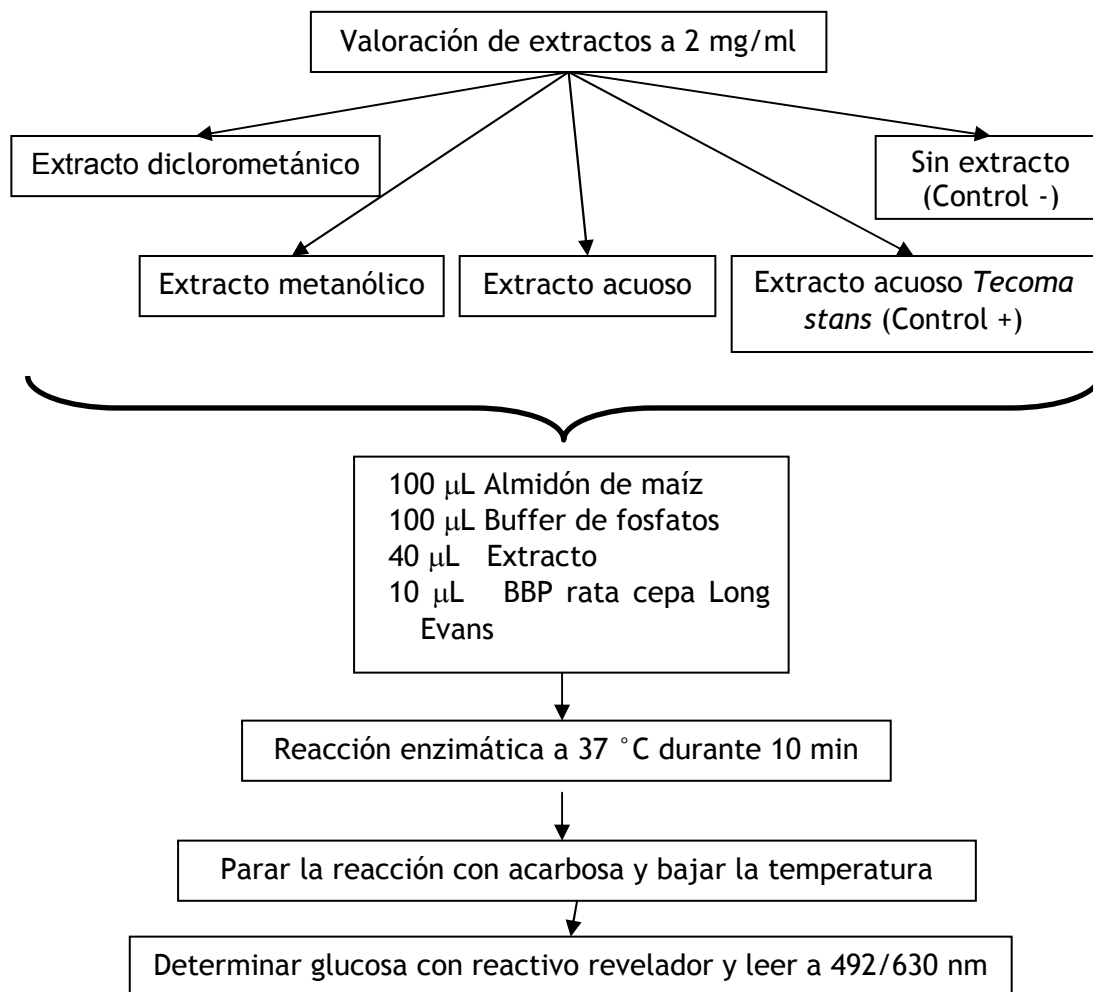


Fig. 5 - Método seguido para evaluar la inhibición de  $\alpha$ -glucosidasas *in vitro* de los extractos de *E. dioeca*.

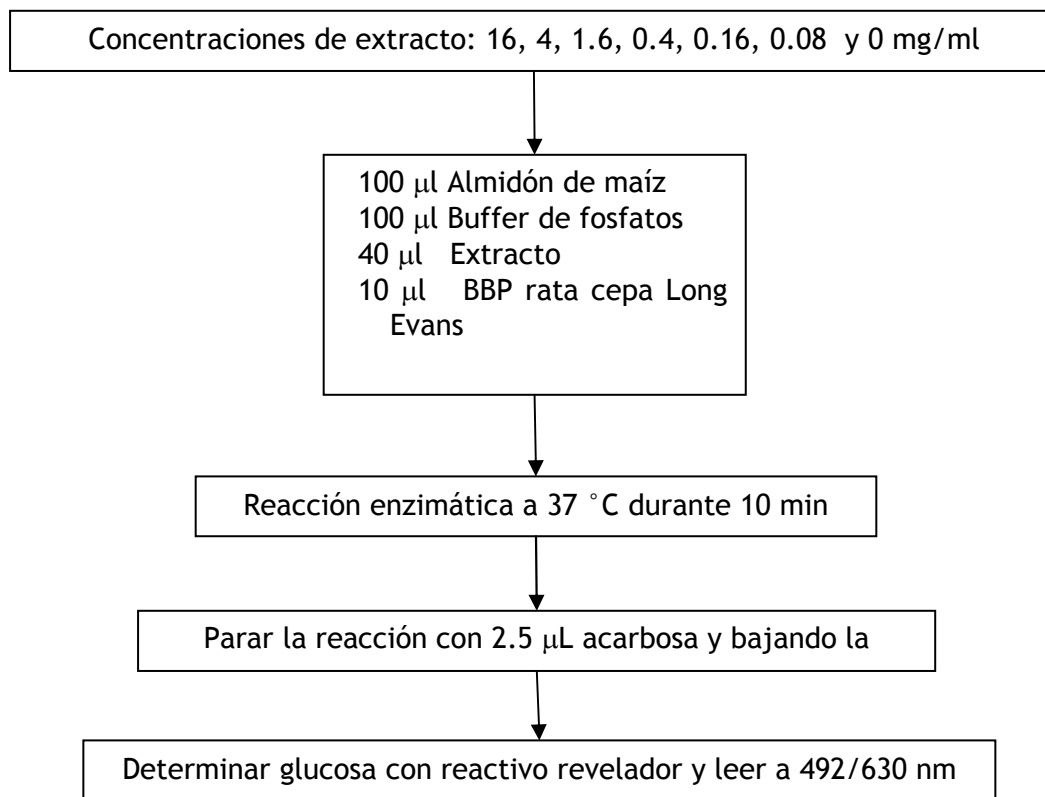


Fig. 6 - Método seguido para obtener la curva dosis - respuesta de la inhibición de  $\alpha$ -glucosidasas *in vitro* de los extractos de *E. dioeca*

#### 6.3.4. Inhibición de $\alpha$ -glucosidasas *in vivo*

El ensayo de inhibición de  $\alpha$ -glucosidasas *in vivo* (Alegría, 2004) se llevó a cabo de manera preliminar en el CIBIS, IMSS y de forma definitiva en el Bioterio de la Facultad de Ciencias, UNAM y en la división de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana, unidad Iztapalapa.

Utilizando los resultados de la valoración de extractos realizada en el ensayo de inhibición de  $\alpha$ -glucosidasas *in vitro*, se eligieron los extractos biológicamente más activos (metanólico y acuoso) para corroborar su efecto en sistemas biológicos vivos.

Los extractos elegidos se prepararon en una dosis de 500 mg/kg; dicha dosificación se suministró a ratas cepa Long Evans previamente diabetizadas con estreptozotocina (STZ).

#### **6.3.4.1. Modelo experimental de diabetes mellitus tipo 2 en ratas macho cepa Long Evans**

Las ratas se diabetizaron bajo el modelo sugerido por el Consorcio de Modelos Animales de Complicaciones Diabéticas (AMDCC), del Instituto Nacional de Salud de los Estados Unidos de América (NIH) (Brosius, 2003).

Se diabetizaron 35 ratas macho cepa Long Evans de un peso aproximado de 250g, proporcionados por el bioterio de Proyecto Camina, A.C.

Los animales se dejaron en ayuno por un periodo de 6 horas antes de inducirse la diabetes por medio de STZ (estreptozotocina marca Axxora) a una concentración de 50 mg/kg.

La STZ se disolvió en un buffer pH 4.5 de citratos, y se suministró en menos de 15 minutos, debido a que la STZ se descompone rápidamente. La vía de administración fue intraperitoneal en una cantidad no mayor a 1.5 ml.

Los animales se dejaron durante una semana en el bioterio de la Facultad de Ciencias con suministro de agua y alimento *ad libitum*. Se registró el peso al finalizar la semana para verificar si habían bajado notoriamente de peso y por tanto se encontraban ya en un estado fisiológico que asemeja individuos que padecen diabetes mellitus (Figura 7).

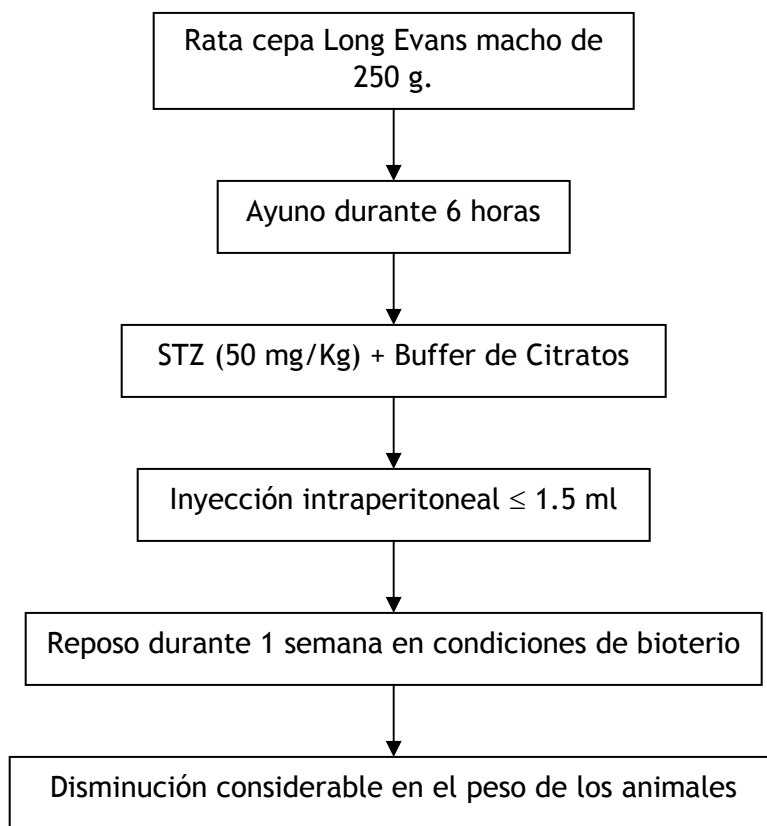


Fig. 7 - Protocolo para generar el modelo animal de Diabetes Mellitus tipo 2

#### 6.3.4.2. Ensayo de inhibición de $\alpha$ -glucosidasas *in vivo*: curva de tolerancia al almidón

Una vez que se contó con las ratas diabéticas el siguiente paso fue corroborar la capacidad inhibitoria de  $\alpha$ -glucosidasas de los extractos de *E. dioeca* en un sistema complejo, *in vivo*.

En un principio se efectuó un ensayo para elegir el control positivo, inhibidor de  $\alpha$ -glucosidasas más apropiado. Se probaron dos controles, acarbose y ácido tánico. Se usaron dos grupos de ratas diabetizadas, con al menos seis horas de ayuno, a las que se les suministró una dosis de 50 mg/kg de los agentes inhibitorios de  $\alpha$ -glucosidasas, vía oral por medio de una sonda orogástrica y posteriormente se les dio por la misma vía almidón (2 g/kg) como agente glucemiante. Se tomaron muestras de sangre iniciales, a los 30, 60, 90 y 120 minutos; a cada una de las muestras se les midió la cantidad de glucosa en suero sanguíneo. El que mejor resultado presentó se utilizó para las curvas de tolerancia al almidón, utilizando todos los extractos.

Los extractos se probaron a una concentración de 500 mg/kg y se utilizó como sustrato almidón de maíz, al igual que en el ensayo de inhibición *in vitro*.

Se formaron cuatro grupos de estudio de ocho ratas cada uno:

- A. sin inhibidor (control negativo)
- B. extracto metanólico
- C. extracto acuoso
- D. acarbosa (Sincrosa®, tabletas de 50 mg, Sector Salud, control positivo), fármaco inhibidor de  $\alpha$ -glucosidasas, en una concentración de 50 mg/kg

El error estimado al trabajar con ocho ratas por lote fue de un máximo de 10.5%, asegurando así la validez estadística de los resultados.

Antes de suministrar el almidón se tomó una muestra de sangre inicial a cada rata con seis horas de ayuno para corroborar su nivel de glicemia original; la toma de sangre se obtuvo a través de un sangrado del extremo caudal de la cola mediante un corte. Se tomaron aproximadamente 200  $\mu$ L de sangre utilizando un capilar heparinizado y las muestras se guardan en frío en microtubos de polímero de 0.6 ml.

Primero se suministró el extracto en una dosis de 500 mg/kg vía oral por medio de una sonda orogástrica, después el almidón de maíz en una dosis de 2 g/kg disuelto en 0.66 g/ml; en el caso de los lotes que fueron tratados con inhibidores, no pasaron más de 10 minutos entre la dosis del extracto y la de almidón. La vía de administración fue también oral por medio de una cánula.

Después de suministrar los inhibidores y el almidón se tomaron muestras de sangre a los 30, 60, 90 y 120 minutos, mediante la técnica descrita previamente.

Las muestras de sangre se centrifugaron durante 5 minutos a 4 500 rpm, para obtener el suero sanguíneo. De cada muestra se tomaron 2.5  $\mu$ l de suero el cual se plaqueó por triplicado en una placa de 96 pozos, en la cual también se dejó una celda libre (blanco) y se colocaron por duplicado estándares de glucosa con 2.5  $\mu$ l, 5  $\mu$ l y 10  $\mu$ l.



Para medir la cantidad de glucosa en el suero se utilizó reactivo de determinación de glucosa (Randox) en una proporción de 250  $\mu$ L en cada pozo y se dejó desarrollar la reacción a 37°C durante 10 minutos. Se leyó la placa en espectrofotómetro a 492nm y 630 nm para conocer el contenido de glucosa en sangre (Figura 8).

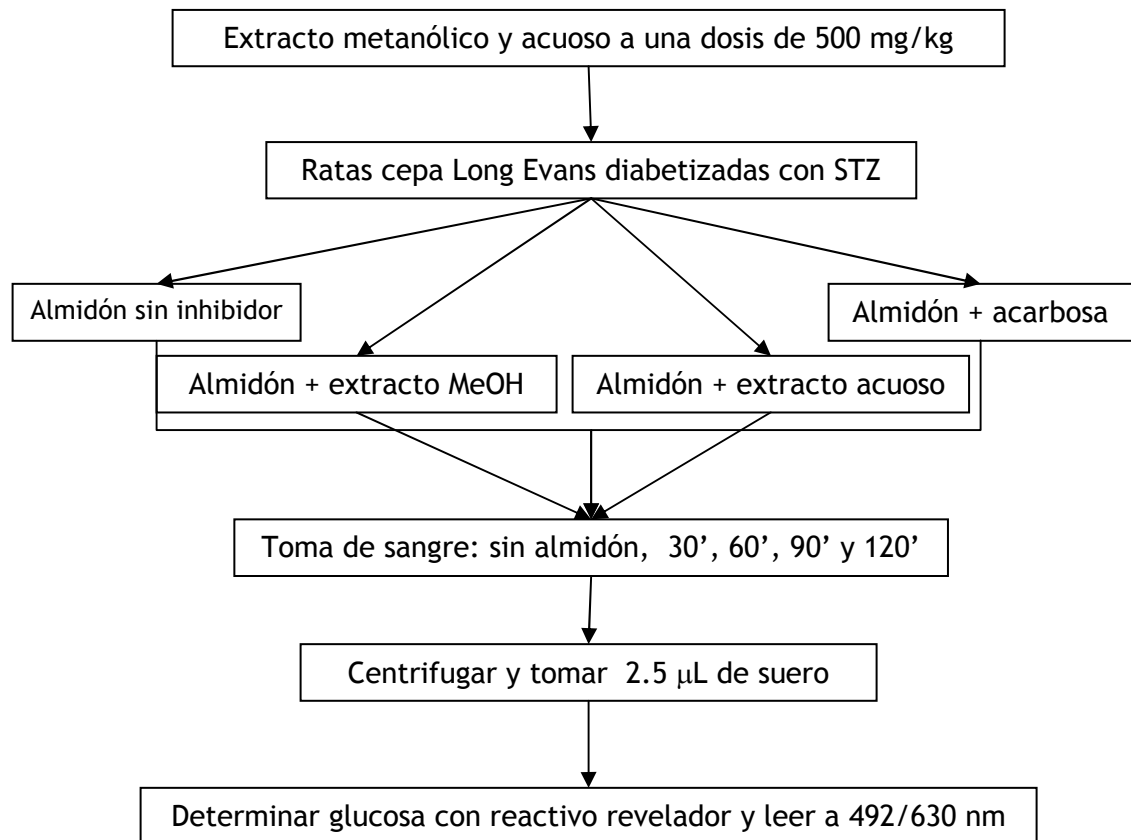


Fig. 8 - Prueba de inhibición de  $\alpha$ -glucosidasas *in vivo*, curva de tolerancia al almidón.

#### 6.4. Análisis estadístico

##### 6.4.1. Diseño experimental

Se realizó un diseño experimental completamente al azar. La unidad experimental (elemento que dio origen al valor de las variables obtenidas), fue una rata cepa Long Evans, en los diferentes tratamientos probados. La comparabilidad de las muestras se consiguió por medio de la asignación aleatoria de las unidades a los grupos de estudio. La validez interna estuvo dada por las mismas características de las ratas en los diferentes tratamientos (sexo y peso), igual número de lotes y ratas en las diferentes

condiciones probadas, así como la colocación de los lotes en las mismas condiciones para los diferentes tratamientos (condiciones de temperatura, humedad y fotoperiodo del Bioterio de la Facultad de Ciencias, UNAM). La variable (% glucemia) se clasifica como numérica continua. El intervalo entre cada medición fue de 30 minutos. En cada lote experimental o tratamiento (sin inhibidor, extracto acuoso, extracto metanólico y acarbosa) se realizaron cinco lecturas (cada lectura se realizó por triplicado) de cada lote (ocho ratas por tratamiento) para obtener el valor promedio de porcentaje de glucemia (Méndez, 1990).

#### 6.4.2. Modelo estadístico

Para la evaluación de los diferentes tratamientos en la inhibición de  $\alpha$ -glucosidasas *in vivo*, se planteó un modelo completamente aleatorizado con un criterio de clasificación. El factor probado fue el tratamiento suministrado a cada lote de ratas, con cuatro niveles: sin inhibidor (control negativo), extracto acuoso, extracto metanólico y acarbosa (control positivo).

El modelo empleado es el siguiente:

$$Y_{ij} = \mu + \tau_i + \varepsilon_{ij}$$

$Y_{ij}$  = Representa el porcentaje de inhibición en la unidad experimental j-ésima (una rata cepa Long Evans), sometida al tratamiento (población i-ésima).

$\mu$  = Representa la media general de la población que contiene los tratamientos.

$\tau_i$  = Representa el efecto del tratamiento ( $\tau_i = \mu_i - \mu$ , donde  $\mu_i$  es la media de la población o tratamiento i-ésimo).

$\varepsilon_{ij}$  = Es el error aleatorio ocasionado por todos los factores no constantes en cada uno de los tratamientos estudiados. Se considera de distribución normal, con media cero y varianza  $\sigma$ .

### 6.4.3. Análisis e interpretación de la información

Los resultados se analizaron mediante un análisis de varianza con un nivel de probabilidad ( $\alpha$ ) 0.05, utilizando el programa estadístico STATISTICA versión '98.

Después de realizar los análisis se obtuvieron dos alternativas:

- 1) El caso de los análisis de varianza donde no se rechazó  $H_0$ , es decir, que no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos al nivel de significancia usado. Esto implica que la variabilidad entre las poblaciones estudiadas es del mismo orden de magnitud que las de los errores y por esto se considera que las medias de los tratamientos (como poblaciones) son iguales.
- 2) El caso de los análisis de varianza donde se rechaza  $H_0$ , es decir, se considera que hay diferencias significativas entre las medias de los tratamientos. En este caso, se aplicaron pruebas de rango múltiple de intervalos de confianza a un nivel de probabilidad  $\alpha = 0.05$  (Tuckey), para distinguir los niveles que causan la diferencia (Méndez, 1976).

## 6. Resultados y discusión

### 7.1. Revisión de herbarios

#### 7.1.1. Mapa de distribución y depósito de ejemplares botánicos

La revisión de herbarios permitió conocer que *Euphorbia dioeca* Kunth se encuentra ampliamente distribuida en el territorio nacional, abarcando distintos tipos de ecosistemas; sin embargo, los estados donde más ejemplares colectados se reportan fueron Veracruz (30%), Oaxaca (27%) y Guerrero (15%) (Figura 9).

Estos datos nos permitieron generar un mapa de distribución (Figura 11), así como elegir el sitio de colecta del material biológico, tomando en cuenta la abundancia y número de ejemplares reportados para ese lugar. De esta forma se eligió Playa La Trocha, municipio de Alvarado, estado de Veracruz (18° 47' 17.5''N, 95° 45' 17.5'' W).

Una vez colectado el material biológico, se prepararon algunas plantas para su depósito en herbarios, de esta forma se depositaron ejemplares botánicos en el Herbario de la Facultad de Ciencias (FCME # 089182 y # 089184), así como en el Herbario del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSSM # 14967) (Figura 10).

Los usos medicinales reportados en los ejemplares de herbario fueron dos, por un lado se señala que el látex tiene la propiedad de curar granos y el otro uso trata acerca del espanto; "*sirve para el espanto "nemugtili" (náhuatl), va junto con muitle y yerba mora que son frías y con el toronjil, que es caliente*".

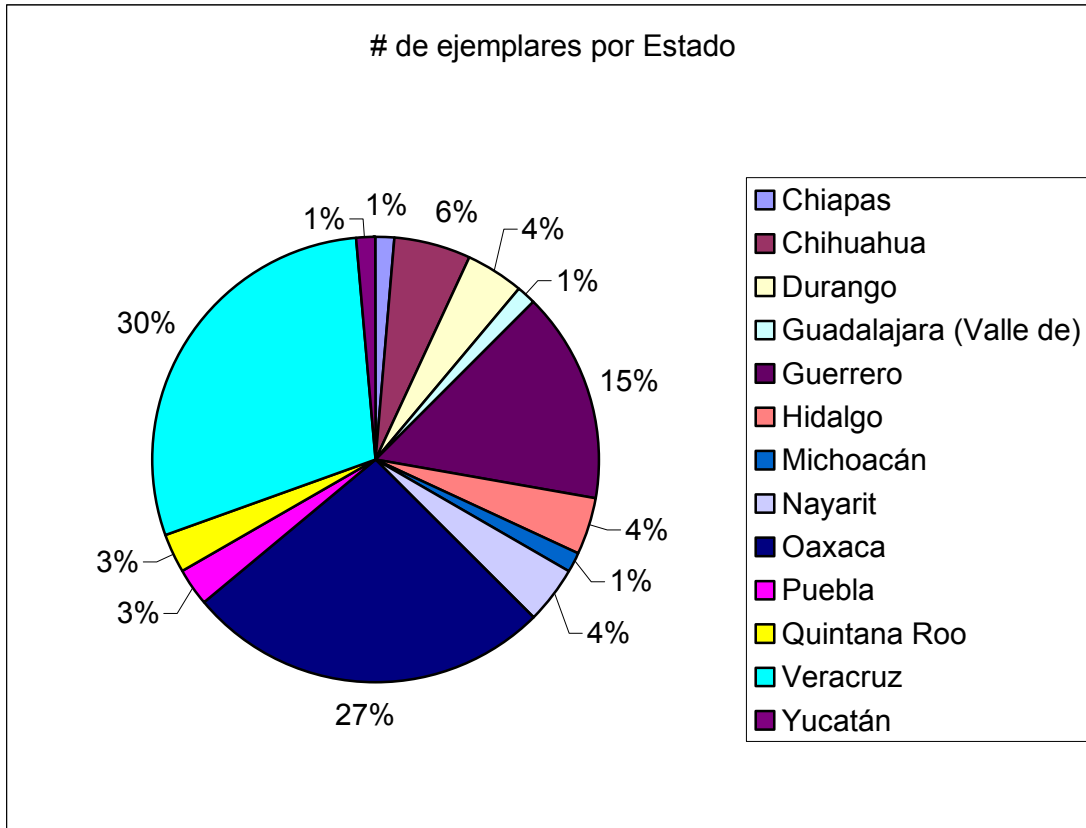


Fig. 9 - Distribución por Estado de los ejemplares de herbario de *Euphorbia dioeca* Kunth

Nombre científico	<i>Euphorbia dioeca</i> Kunth (ex <i>Chamaesyce dioeca</i> (Kunth) Millsp.)
Fecha de colecta	21 de Agosto del 2004
Localidad	Playa La Trocha, Alvarado, Veracruz
Coordenadas	18°47'17.5" N 95°45'17.5" W
Tipo de Vegetación	Dunas costeras
Altitud	Nivel del mar (0 msnm)
Tipo de suelo	Arena
Forma biológica	Hierba postrada
Frecuencia	Manchones aislados
Colector	Sol Cristians Niizawa
Determinó	Sol Cristians Niizawa

Fig. 10 - Ficha del ejemplar botánico de *Euphorbia dioeca* Kunth



Fig. 11 - Mapa de distribución de *Euphorbia dioeca* Kunth

Si bien *Euphorbia dioeca* Kunth es una planta distribuida en varios tipos de vegetación del país, podemos ver en la revisión de herbarios, que no ha sido tan colectada pues son menos de setenta ejemplares los que se encontraron. También se observó que a nivel de usos populares no existe mucha información, ya que sólo se encontraron dos reportes, y no se encuentra mayor información etnobotánica referente a la especie en otras fuentes bibliográficas.

El nombre vulgar con el que se conoce a *Euphorbia dioeca* Kunth es “golondrina” o “hierba de la golondrina”, también se reconocen otras especies del género *Euphorbia* (*E. maculata* L. y *E. postrata* Aiton), las cuales han sido reportadas como plantas hipoglucemiantes con uso tradicional, usando las hojas en infusión y con reportes fitoquímicos de presencia de flavonoides (Andrade-Cetto, 2005).

Este género ha sufrido modificaciones taxonómicas, lo cual complica la recopilación de información al generar registros de ejemplares bajo nombres erróneos, aunque cabe mencionar que la revisión de herbarios se efectuó para todas las sinonimias reportadas.

## 7.2. Estudio fitoquímico

### 7.2.1. Rendimiento de los extractos

Tanto las extracciones realizadas con Soxhlet como la efectuada por medio de infusión presentaron bajos rendimientos, la mayoría no superó el 10%, sólo el extracto metanólico presentó un rendimiento considerable (Cuadro 2). Sin embargo, las cantidades extraídas fueron suficientes para realizar las pruebas fitoquímicas y farmacológicas.

Cuadro 2 - Rendimiento de los extractos de *E. dioeca* (\*) - corresponde al peso del extracto liofilizado

Extracto	Peso planta seca (g)	Peso extracto (g)	% Rendimiento
<i>Hexano</i>	60 g	4.0567	6.76
<i>Diclorometano</i>	60 g	1.1079	1.84
<i>Metanol</i>	60 g	16.9384	28.23
<i>Acuoso</i>	200 g	5.0235*	2.51

El rendimiento de los extractos es, en general, bajo; los extractos de hexano y diclorometano presentaron menos de 10% de rendimiento. En el caso del extracto acuoso, no se pudo obtener el peso sin liofilizar, por lo que el valor reportado muestra un rendimiento muy bajo, el cual no es comparable con el de los demás extractos cuyo peso reportado es el no liofilizado, por lo que seguramente el rendimiento para el extracto acuoso pudo ser mayor. En cuanto al extracto metanólico, este fue el único que presentó valor de rendimiento considerable (28.23%).

Se requeriría gran cantidad de material botánico para tener cantidades mayores de extracto; sin embargo, se trata de una planta que crece de forma abundante y con una biomasa considerable por individuo lo que no dificulta la obtención del material de estudio.

### 7.2.2. Pruebas cualitativas para los principales grupos de metabolitos secundarios

Las pruebas cualitativas para grupos generales de metabolitos secundarios mostraron que los extractos que presentaron mayor cantidad de compuestos

fitoquímicos fueron el metanólico y el acuoso. El extracto metanólico presentó fenoles, flavonoides y taninos; mientras que el extracto acuoso presentó glucósidos, fenoles y taninos (Cuadro 3).

Si bien comparten la presencia de fenoles y taninos, el extracto metanólico presenta una reacción colorida más notoria, por lo tanto una mayor cantidad de dichos metabolitos secundarios.

Cuadro 3 - Prueba cualitativa de metabolitos secundarios de los extractos de *E. dioeca* (- resultado negativo, + ligeramente positiva, ++ positiva, +++ fuertemente positiva, mayor cantidad de metabolito)

Prueba	Extracto	Resultado
Mölich	<i>Hexano</i>	-
	<i>Diclorometano</i>	-
	<i>Metanol</i>	1× -   2× -
	<i>Acuoso</i>	++
Draggendorf	<i>Hexano</i>	-
	<i>Diclorometano</i>	-
	<i>Metanol</i>	-
Ác. Silicotúngstico	<i>Hexano</i>	-
	<i>Diclorometano</i>	+
	<i>Metanol</i>	-
	<i>Acuoso</i>	-
Flavonoides	<i>Hexano</i>	++
	<i>Diclorometano</i>	+
	<i>Metanol</i>	+++
	<i>Acuoso</i>	-
Fenoles	<i>Hexano</i>	+
	<i>Diclorometano</i>	-
	<i>Metanol</i>	++
	<i>Acuoso</i>	++
Taninos	<i>Hexano</i>	+
	<i>Diclorometano</i>	+
	<i>Metanol</i>	+++
	<i>Acuoso</i>	++
Terpenos	<i>Hexano</i>	++
	<i>Diclorometano</i>	+
	<i>Metanol</i>	-
	<i>Acuoso</i>	-

Los extractos metanólico y acuoso fueron los más complejos fitoquímicamente hablando, fueron positivos a un mayor número de grupos de metabolitos secundarios y



la reacción colorida que desarrollaron fue más notoria. El extracto metanólico fue positivo a flavonoides, el acuoso a glucósidos, y ambos fueron positivos a fenoles y taninos; siendo los flavonoides, fenoles y taninos, metabolitos secundarios considerados como inhibidores enzimáticos y antioxidantes en el caso de flavonoides y taninos (Bruneton, 2001). Dicha característica fitoquímica está relacionada con la actividad farmacológica que se busca, ya que los inhibidores enzimáticos están relacionados a la inhibición de  $\alpha$ -glucosidasas y por tanto al control de la diabetes mellitus tipo 2. En cuanto a la presencia de antioxidantes, característica relacionada con la captación de radicales libres (compuestos altamente carcinogénicos) (National Cancer Institute, 2005). Sería importante evaluar la interacción de compuestos presentes en *E. dioeca* en relación a tratamientos preventivos contra el cáncer.

### 7.2.3. Cuantificación de compuestos fenólicos

La prueba de cuantificación de compuestos fenólicos (Figura 12), mostró coincidencia con los resultados obtenidos en la prueba cualitativa de metabolitos secundarios, ya que se presentó mayor concentración en el extracto metanólico, seguido por el acuoso y por último, una concentración marcadamente menor que en los dos extractos anteriores, el diclorometánico.

Cuando se analizó el 100% de la solución madre (4 mg/ml), se observó que el extracto metanólico presentó 219.65  $\mu\text{g/ml}$  de unidades equivalentes de ácido tánico, mientras que el extracto acuoso en la misma concentración presentó 193.98  $\mu\text{g/ml}$ , y el diclorometánico 128.25  $\mu\text{g/ml}$ .

Dicho comportamiento sugiere que los extractos metanólico y acuoso son biológicamente más activos en referencia a los compuestos fenólicos presentes.

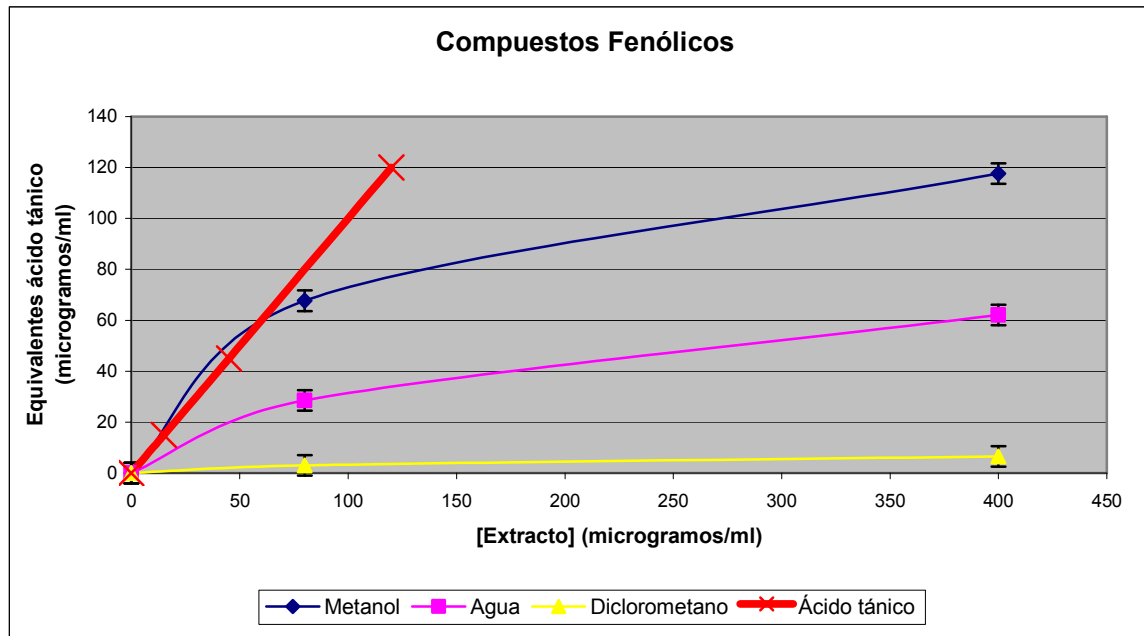


Fig. 12 - Gráfica de cuantificación de compuestos fenólicos en los extractos metanólico, acuoso y diclorometánico de *E. dioeca*.

Dentro de los compuestos fenólicos se puede encontrar que se clasifican los fenoles, taninos y flavonoides, metabolitos secundarios cuya actividad de inhibición enzimática ya ha sido reportada (Bruneton, 2001).

Una vez más cabe recalcar la importancia en la complejidad fitoquímica de los extractos metanólico y acuoso, la cual reside en su posterior respuesta biológica en las pruebas farmacológicas, sobretodo en las referentes a inhibición de  $\alpha$ -glucosidasas.

### 7.3. Estudio farmacológico

#### 7.3.1. Pruebas de citotoxicidad

En el ensayo de citotoxicidad en las líneas celulares tumorales de carcinoma de colon (COLON), carcinoma de cérvix (UISO) y carcinoma nasofaríngeo (KB), se obtuvo un resultado negativo, ya que ninguno de los extractos presentó un efecto citotóxico; la dosis necesaria para reducir al 50% el crecimiento celular ( $ED_{50}$ ) nunca fue inferior a 20  $\mu\text{g/ml}$  (Cuadro 4), de hecho las  $ED_{50}$  calculadas fueron muy superiores a dicho valor (Swanson, y Pezzuto, 1986).

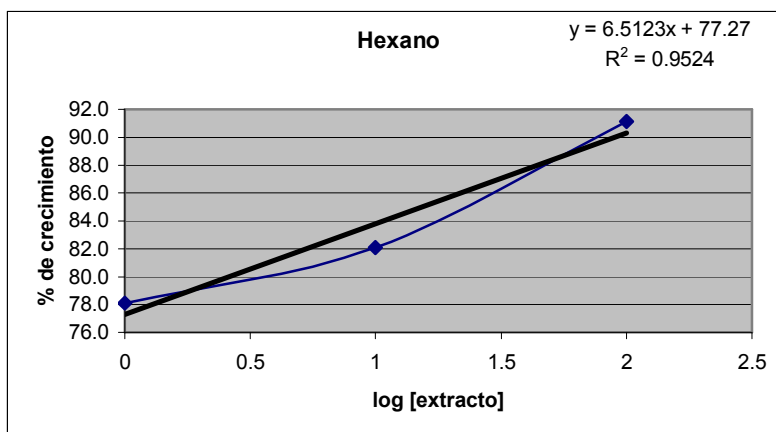
Cuadro 4 - Pruebas de citotoxicidad, ED<sub>50</sub> en las distintas líneas celulares

Extracto / Línea celular	COLON		KB		UI50	
	ED <sub>50</sub> µg/ml	ED <sub>50</sub> teórico (µg/ml)	ED <sub>50</sub> µg/ml	ED <sub>50</sub> teórico (µg/ml)	ED <sub>50</sub> µg/ml	ED <sub>50</sub> teórico (µg/ml)
<b>Hexano</b>	<20	6.4944×10 <sup>-5</sup>	>20	3.03614×10 <sup>16</sup>	<20	8.07471×10 <sup>-7</sup>
<b>Diclorometano</b>	>20	197.451059	<20	4.09044×10 <sup>-15</sup>	>20	16112.61387
<b>Metanol</b>	>20	762.646414	>20	390.3803522	>20	350848.645
<b>Agua</b>	>20	51547475.6	>20	2279.374804	>20	2140409416

Se realizaron los análisis de varianza para comparar el efecto de cada extracto en las distintas líneas celulares tumorales; sin embargo, al no tener una ED<sub>50</sub> menor a la mínima establecida por los estándares internacionales, no se muestran los análisis estadísticos realizados.

### 7.3.1.1. Línea celular tumoral de carcinoma de colon (COLON)

De las tres líneas celulares, la que tuvo un crecimiento más apropiado fue la de cáncer de colon, ya que casi cuadruplicó la población celular en 72 horas (3.793 veces; cociente del tubo control entre el tubo tiempo inicial). Sin embargo, ninguno de los extractos presentó inhibición en el crecimiento celular, pero tampoco incrementó el mismo; por lo que no presentaron efecto alguno sobre la línea celular (Figura 13).



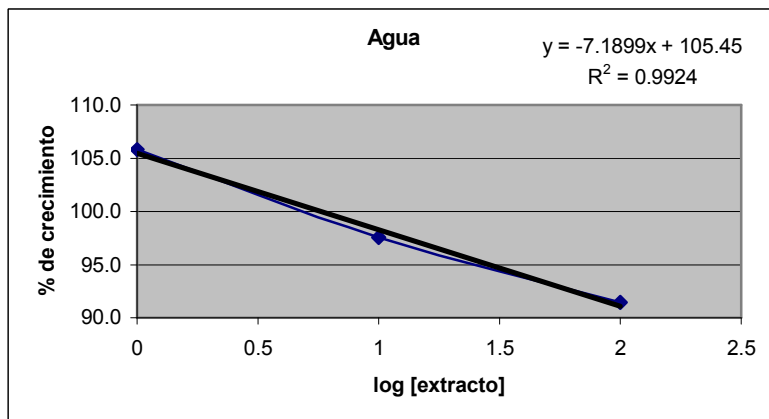
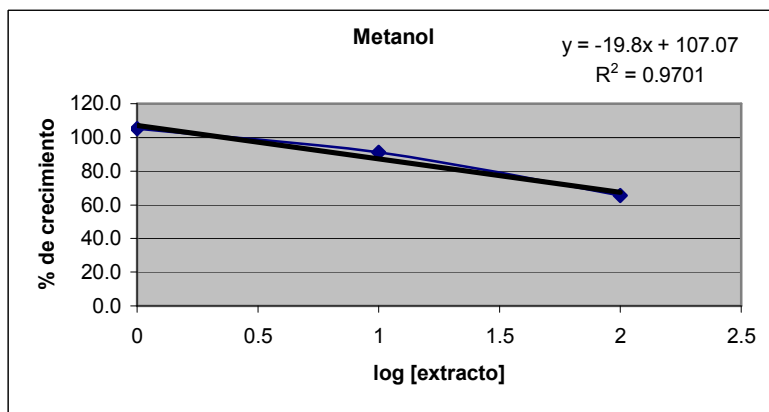
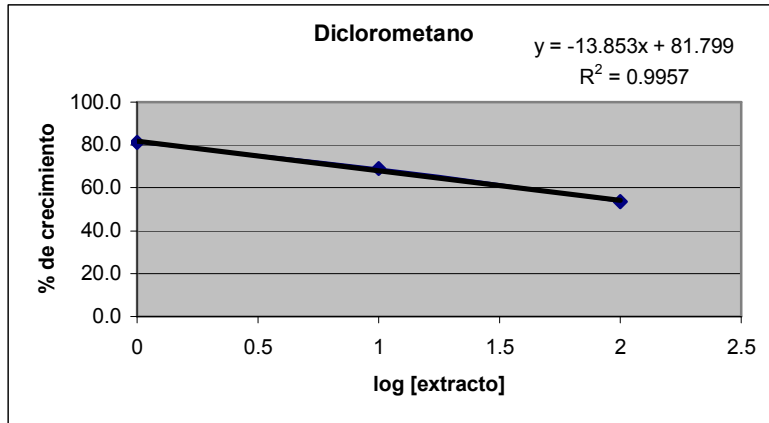
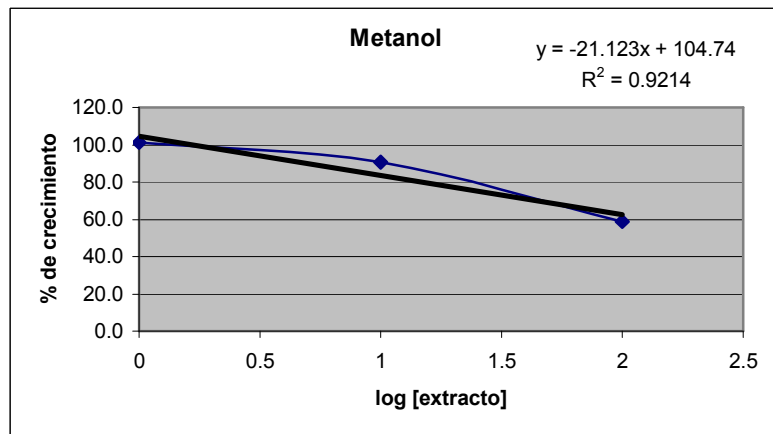
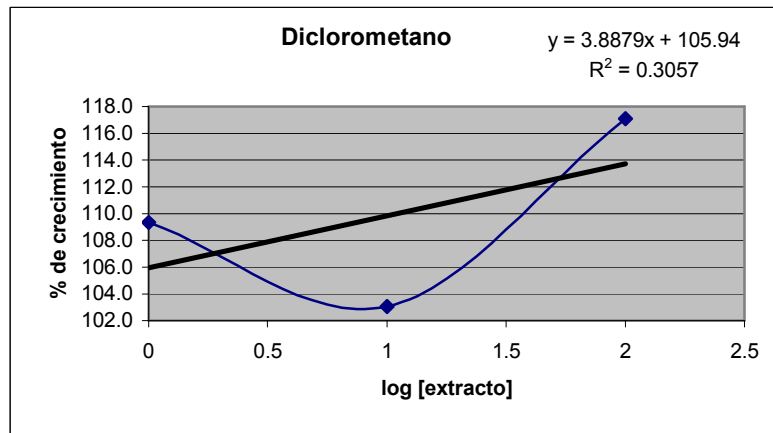
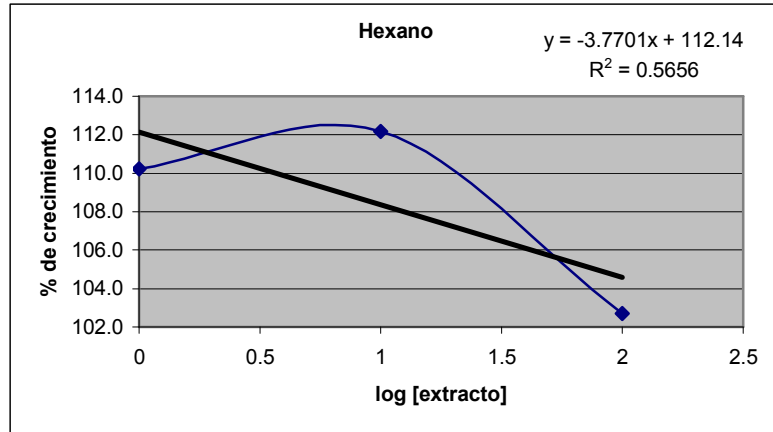


Figura 13 – Gráficas referentes a la prueba de citotoxicidad en línea celular tumoral de carcinoma de colon (COLON) con los extractos de *E. dioeca*

### 7.3.1.2. Línea celular tumoral de carcinoma nasofaríngeo (KB)

Esta línea celular triplicó su biomasa durante las 72 horas (2.973 veces). En esta línea celular ningún extracto tuvo una actividad inhibitoria, ya que ni disminuyó ni

incrementó el crecimiento celular; y presentó dosis con ED<sub>50</sub> muy elevadas para los estándares buscados. En el caso de los extractos hexánico y diclorometánico los resultados del conteo celular presentaron una gran dispersión entre sí, siendo poco confiables los resultados ( $R^2=0.56$  y  $R^2=0.30$  respectivamente) (Figura 14).



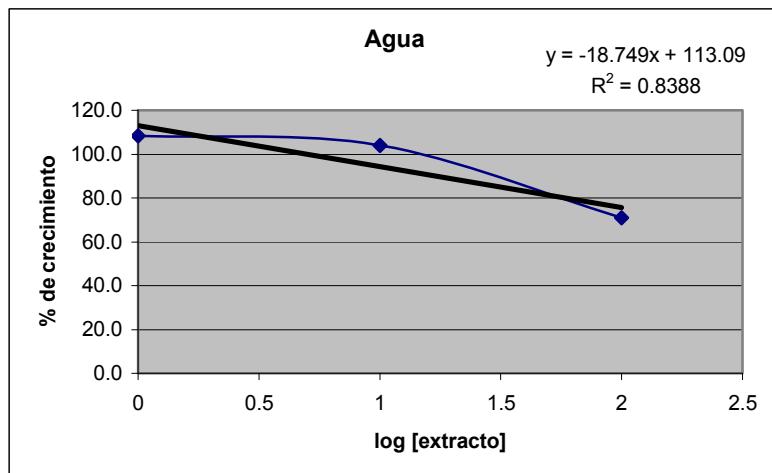
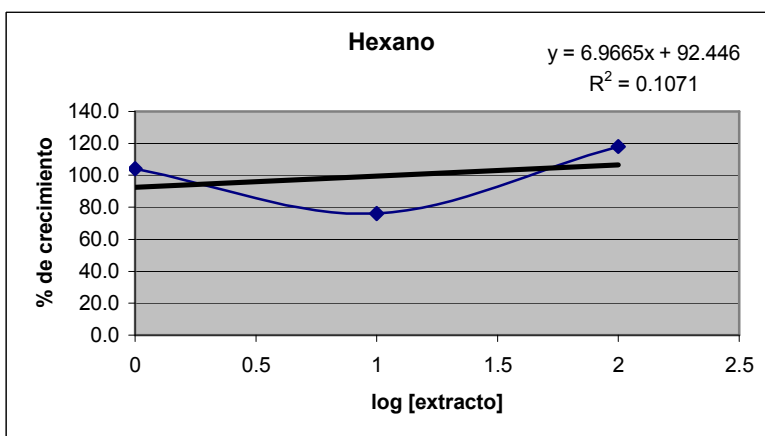


Figura 14 - Gráficas referentes a la prueba de citotoxicidad en la línea celular de carcinoma nasofaríngeo (KB) con los extractos *E. dioeca*

### 7.3.1.3. Línea celular tumoral de carcinoma de cérvix (UISO)

En ésta línea celular prácticamente no existió desarrollo celular (1.35 veces). Ninguno de los extractos tuvo un efecto ya que no existió inhibición ni incremento del número celular. Por otro lado, ninguno de los extractos presentó linealidad en sus resultados (hexano  $R^2 = 0.107$ , diclorometano  $R^2 = 0.507$ , metanol  $R^2 = 0.075$ , acuoso  $R^2 = 0.374$ ) (Figura 15).



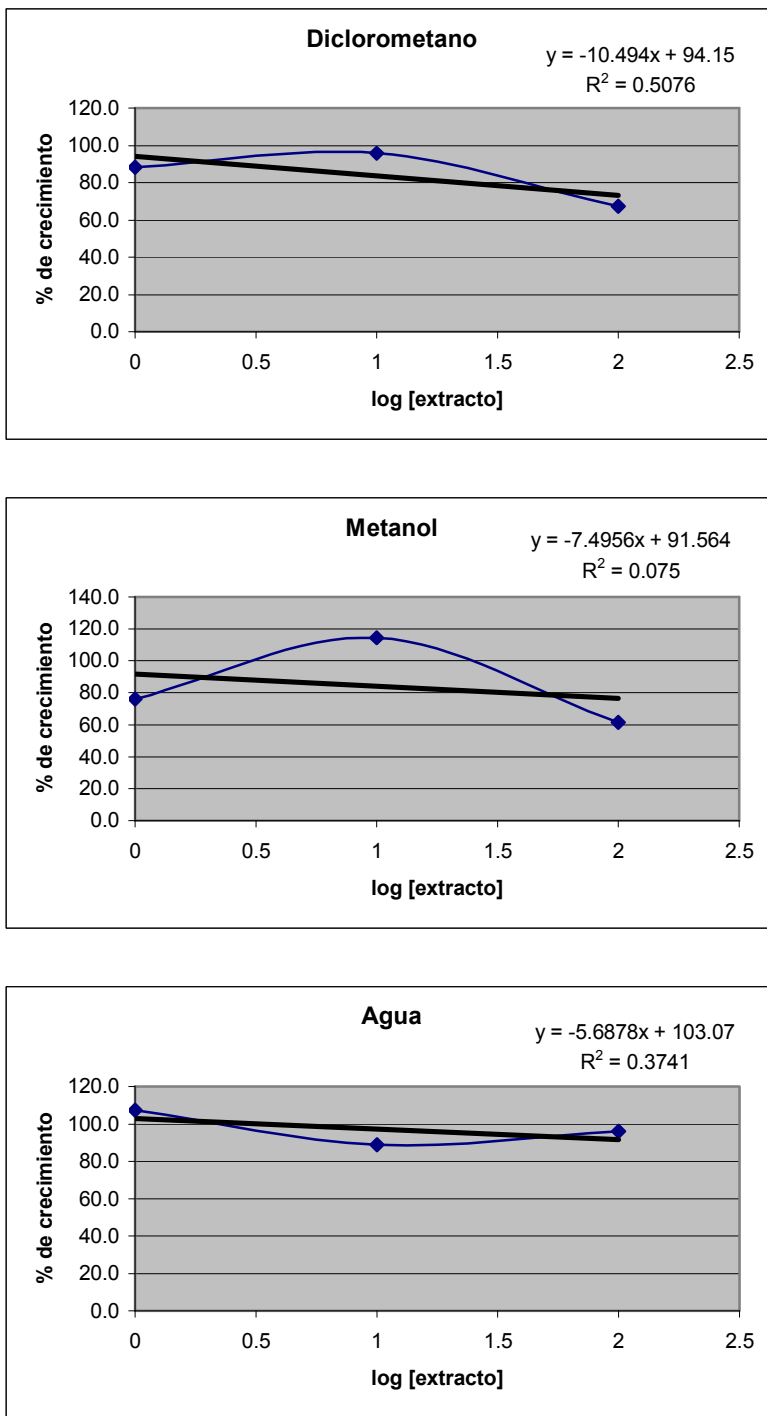


Figura 15 – Gráficas referentes a la prueba de citotoxicidad en línea celular tumoral de carcinoma de cérvix (UISO) con los extractos de *E. dioeca*

Los resultados obtenidos en las pruebas de citotoxicidad muestran que ninguna  $ED_{50}$  fue menor a  $20 \mu\text{g/ml}$ , y al calcular el valor teórico de la dosis necesaria para reducir al 50% el crecimiento celular, encontramos valores sumamente altos, del orden de concentración de gramos por mililitro para poder inhibir el crecimiento celular.

Los extractos hexánico en la línea de carcinoma de colon y diclorometánico en las líneas de carcinoma nasofaríngeo y de cérvix, promovieron el crecimiento celular en vez de inhibirlo, ya que aumenta levemente la biomasa celular; sin embargo, los valores teóricos calculados son ínfimos, por esta razón no se puede considerar un valor menor a 20 µg/ml, ni tampoco un efecto citotóxico.

En cuanto al comportamiento de cada línea celular tumoral evaluada, encontramos distintas respuestas. El caso de la línea celular de carcinoma de colon (COLON) es la de mejor comportamiento celular, ya que presentó el mejor crecimiento, casi cuadruplicando la población celular. Por otro lado fue el que presentó resultados más fidedignos, pues el margen de error fue muy bajo en cada uno de los extractos evaluados.

La línea celular de carcinoma nasofaríngeo (KB) triplicó su número celular, no obstante, en las pruebas con los extractos hexánico y diclorometánico los márgenes de error fueron altos, dando como resultado un comportamiento poco fidedigno.

En el caso de la línea celular de carcinoma de cérvix (UISO) se observó un crecimiento casi nulo, además de presentar los márgenes de error más altos de las tres líneas celulares tumorales, teniendo así resultados poco fidedignos; el comportamiento de esta línea celular puede estar relacionado a la cantidad de pases que se habían realizado antes de utilizar el cultivo, ya que al repetir muchas veces dicho proceso las células en suspensión dejan de reproducirse correctamente.

En general, no existe acción citotóxica en ninguno de los extractos de *E. dioeca* sobre las líneas celulares tumorales evaluadas, pues no varía la población celular. Los extractos no inhibieron, ni promovieron de forma considerable el crecimiento celular.

### **7.3.2. Toxicidad aguda**

El ensayo de toxicidad aguda mostró que los extractos suministrados (metanólico y acuoso) en una dosis elevada (6 g/kg) no produjeron alteración fisiológica o conductual en los animales; los seis ratones por grupo examinados mostraron signos de total normalidad en las distintas observaciones realizadas.

Se monitoreó a los animales durante la primera hora, y tampoco presentaron alteración fisiológica o conductual notoria, todos se movían, comían y bebían con normalidad.



Se realizaron observaciones a las 6, 12 y 24 horas subsecuentes y tampoco presentaron alteración alguna.

Se efectuó una última observación a los 15 días de suministrada la sustancia para verificar si existía algún tipo de alteración a largo plazo, y los animales se encontraron en un estado normal, sin alteración fisiológica o conductual evidente, sobreviviendo todos.

Como un primer enfoque para corroborar si los extractos metanólico y acuoso presentaban toxicidad aguda se empleó el protocolo 423, denominado "Toxicidad aguda por el método de clases", empleado por la OECD para regular el comercio de sustancias químicas entre los países miembros. El protocolo 423 indica que de no existir alteraciones conductuales o fisiológicas al administrar una dosis única de 5 gramos por kg a 3 roedores durante las primeras 24 horas y además, no hay defunciones en 15 días de observación, el preparado se considera "inocuo" (OECD; 2000).

El uso de modelos biológicos complejos, como los animales de laboratorio, permite conocer el efecto de los extractos vegetales sobre los sistemas anatómicos y fisiológicos animales, no sólo en el órgano o proceso metabólico diana, como se puede analizar en un modelo *in vitro*.

Si se desea proponer un determinado extracto vegetal como fitofármaco, siempre es necesario conocer si va a ser o no dañino para el organismo, por lo que las pruebas de toxicidad son indispensables; y cabe destacar que el protocolo 423 aboga por la reducción de animales de laboratorio, basando las pruebas en concentraciones altas del compuesto a evaluar.

De esta forma el ensayo de toxicidad aguda permitió ver la inocuidad de los extractos metanólico y acuoso de *E. dioeca*.

Este resultado es de gran importancia ya que permite realizar distintas pruebas farmacológicas *in vivo*.

### **7.3.3. Inhibición de $\alpha$ -glucosidasas *in vitro***

El ensayo preliminar de inhibición de  $\alpha$ -glucosidasas *in vitro* demostró que a una concentración de 2 mg/ml, solamente los extractos metanólico y acuoso presentaron una actividad inhibitoria de  $\alpha$ -glucosidasas considerable (78.5% y 56.7% respectivamente), superando de esta forma al control conocido (extracto acuoso de *Tecoma stans* (46.2%))

(Figura 16), por lo que los extractos antes mencionados se sometieron a una valoración en una gama de concentraciones distintas para obtener la curva dosis - respuesta que permite caracterizar farmacológicamente a cada uno de éstos.

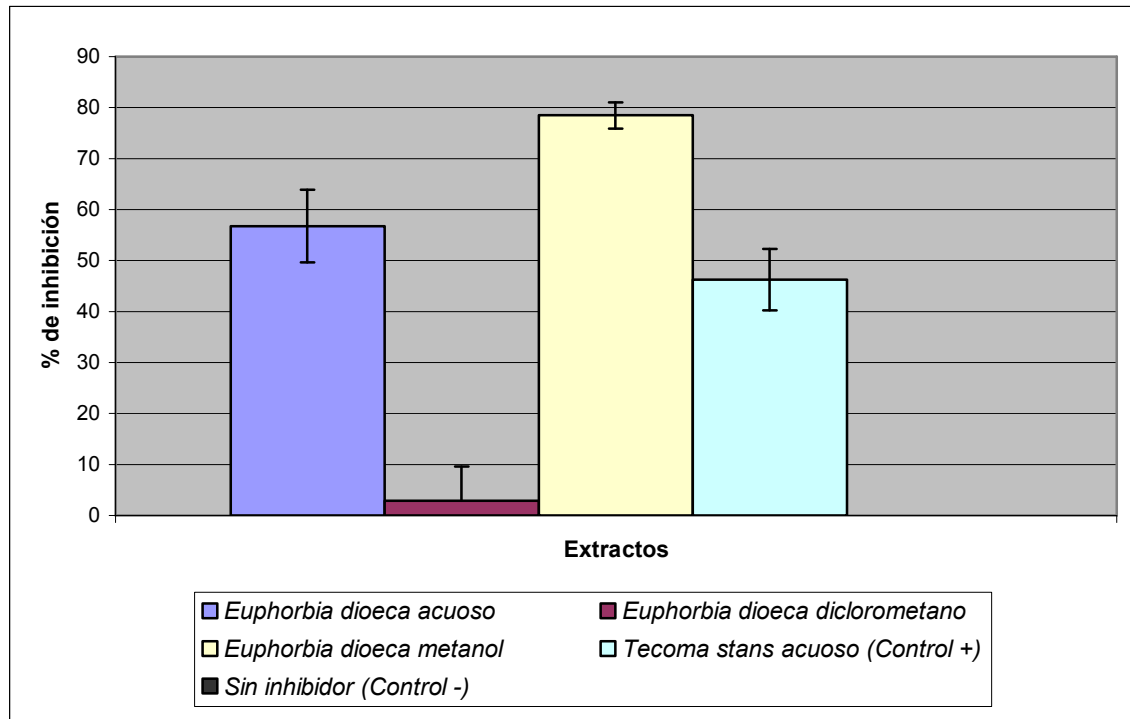


Figura 16 - Ensayo preliminar de inhibición de  $\alpha$ -glucosidasas (2 mg/ml) con los extractos metanólico y acuoso de *E. dioeca*.

Los extractos metanólico y acuoso de *E. dioeca* presentaron un porcentaje de inhibición de  $\alpha$ -glucosidasas alto, similar e inclusive superior al registrado por el extracto acuoso de *T. stans* el cual había demostrado actividad inhibitoria significativa (Tapia, 2006).

La mayor actividad inhibitoria de los extractos metanólico y acuoso de *E. dioeca* está relacionada con los resultados de las pruebas fitoquímicas, pues se trata de los extractos fitoquímicamente más activos, conteniendo una mayor concentración de compuestos fenólicos, con grupos de metabolitos secundarios como flavonoides, fenoles y taninos, los cuales están reportados como inhibidores enzimáticos (Bruneton, 2001); es probable que la mayor actividad inhibitoria de  $\alpha$ -glucosidasas pueda estar ligada a algún compuesto perteneciente a dichos grupos de metabolitos secundarios.

Cabe resaltar que los extractos de *E. dioeca* que mostraron mejores resultados, están relacionados a la forma en la que normalmente se preparan los remedios botánicos en la medicina tradicional, esto es en infusión (similar al extracto acuoso) o en maceraciones en alcohol (similar al extracto metanólico).

### 7.3.3.1. Curva dosis - respuesta extracto metanólico

La curva dosis-respuesta obtenida mostró un claro comportamiento dosis dependiente, ya que a mayor dosis mayor porcentaje de inhibición de  $\alpha$ -glucosidasas. La curva muestra una tendencia a estabilizarse al alcanzar las dosis máximas probadas, prácticamente no varió la respuesta inhibitoria entre las concentraciones más elevadas (93.96% y 96.64% para 4 y 16 mg/ml respectivamente (Figura 17).

En las condiciones en las que se llevó a cabo el experimento: homogenado de epitelio intestinal (BBP) de rata cepa Long Evans como fuente de  $\alpha$ -glucosidasas y almidón como sustrato (12.5 mg/ml), el extracto metanólico presentó un nivel de inhibición máximo de 96.64% (Cuadro 5).

Se encontró una diferencia significativa entre los distintos porcentajes de inhibición a las distintas concentraciones en las que se evaluó el extracto ( $F=220.69$ ,  $P=0.0000001$ ) (Apéndice 1, Cuadro 1). Al analizar los efectos entre cada una de las concentraciones encontramos que entre las dos últimas concentraciones (4 y 16 mg/ml) no existen diferencias significativas en la respuesta inhibitoria de  $\alpha$ -glucosidasas; entre el resto de las concentraciones (0.08, 0.16, 0.4, 1.6 y 4) se presentan diferencias significativas (Apéndice 1, Cuadro 2).

Por otro lado los datos presentaron consistencia en cada una de las repeticiones efectuadas, presentando así un error muy bajo ( $R^2= 0.971$ ).

En cuanto a la dosis efectiva para inhibir al 50% las  $\alpha$ -glucosidasas ( $ED_{50}$ ) encontramos que se necesitan 0.432 mg/ml de extracto metanólico de *E. dioeca*; si consideramos que cualquier extracto de origen vegetal, evaluado a 2 mg/ml, presenta un porcentaje de inhibición de  $\alpha$ -glucosidasas mayor al 50% es un candidato a la generación de fitofármacos para el control de diabetes mellitus tipo 2, el extracto metanólico de *E. dioeca* se vuelve un aspirante prometedor para dicha actividad, mostrando un valor superior a muchos otros extractos vegetales evaluados (Tapia, 2006).

Cuadro 5 - Extracto metanólico, respuesta inhibitoria de  $\alpha$ -glucosidasas a distintas concentraciones.

Concentración extracto (mg/ml)	0.08	0.16	0.4	1.6	4	16	$DE_{50}$ (mg/ml)
Porcentaje de inhibición (%)	14	27.82	42.79	77.54	93.96	96.64	0.432

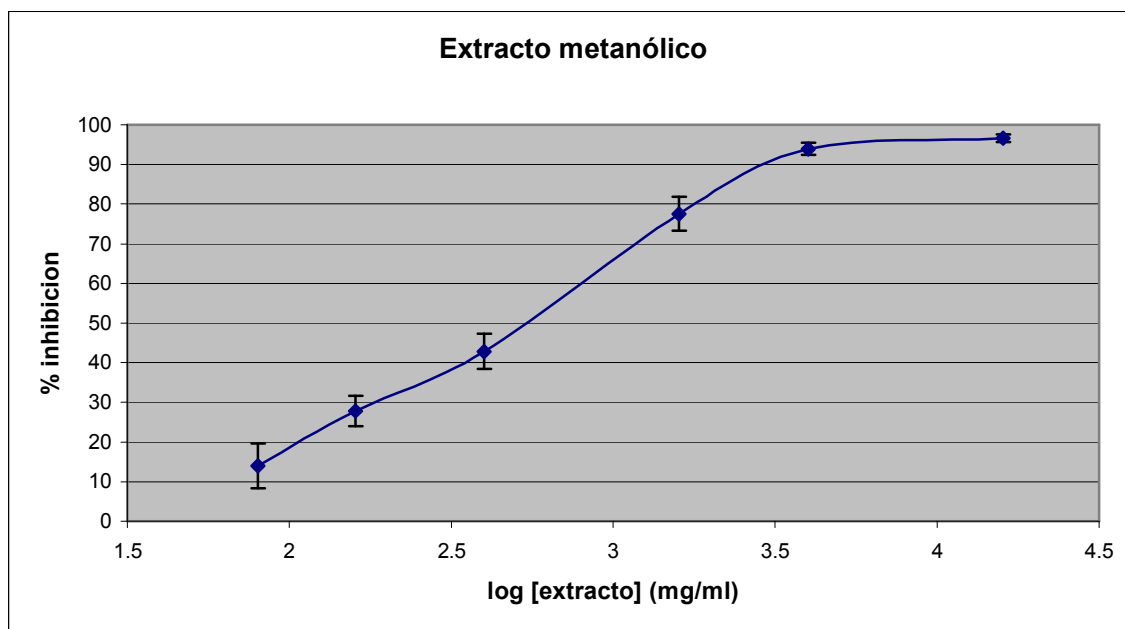


Figura 17 - Curva dosis - respuesta del extracto metanólico de *E. dioeca*, en la inhibición de  $\alpha$ -glucosidasas.

### 7.3.3.2. Curva dosis - respuesta extracto acuoso

La curva dosis-respuesta obtenida para el extracto acuoso mostró también un comportamiento dosis dependiente, en este caso la curva presentó una asíntota en la sección de concentraciones mínimas probadas, la respuesta inhibitoria de  $\alpha$ -glucosidasas prácticamente no varió entre la concentración de 0.08 mg/ml y la de 0.16 mg/ml (25.66% y 32.51% respectivamente) (Figura 18).

El extracto acuoso, en las condiciones en las que se llevó a cabo el experimento, presentó un nivel de inhibición máximo de 88.82% (Cuadro 6).

Se encuentra una diferencia significativa entre los distintos porcentajes de inhibición de las distintas concentraciones en las que se evaluó el extracto ( $F=199.07$ ,  $P=0.0000001$ ) (Apéndice 1, Cuadro 3). Al analizar los efectos entre cada una de las concentraciones se encuentra que la diferencia entre las concentraciones mínimas (0.08 y

0.16 mg/ml) no es significativa en la respuesta inhibitoria de  $\alpha$ -glucosidasas; entre el resto de las concentraciones (0.016, 0.4, 1.6, 4 y 16 mg/ml) sí se encuentran diferencias significativas (Apéndice 1, Cuadro 4).

En esta curva dosis-respuesta también se encuentra que los datos presentaron consistencia en cada una de las repeticiones efectuadas, con un margen de error muy bajo ( $R^2= 0.964$ ).

La  $DE_{50}$  del extracto acuoso de *E. dioeca* fue de 0.527 mg/ml, siendo también en este caso un valor muy prometedor, ya que refleja el potencial inhibitor de  $\alpha$ -glucosidasas de dicho extracto.

Cuadro 6 - Extracto acuoso, respuesta inhibitoria de  $\alpha$ -glucosidasas a distintas concentraciones.

Concentración extracto (mg/ml)	0.08	0.16	0.4	1.6	4	16	$DE_{50}$ (mg/ml)
Porcentaje de inhibición (%)	25.66	32.51	38.65	59.88	76.20	88.82	0.527

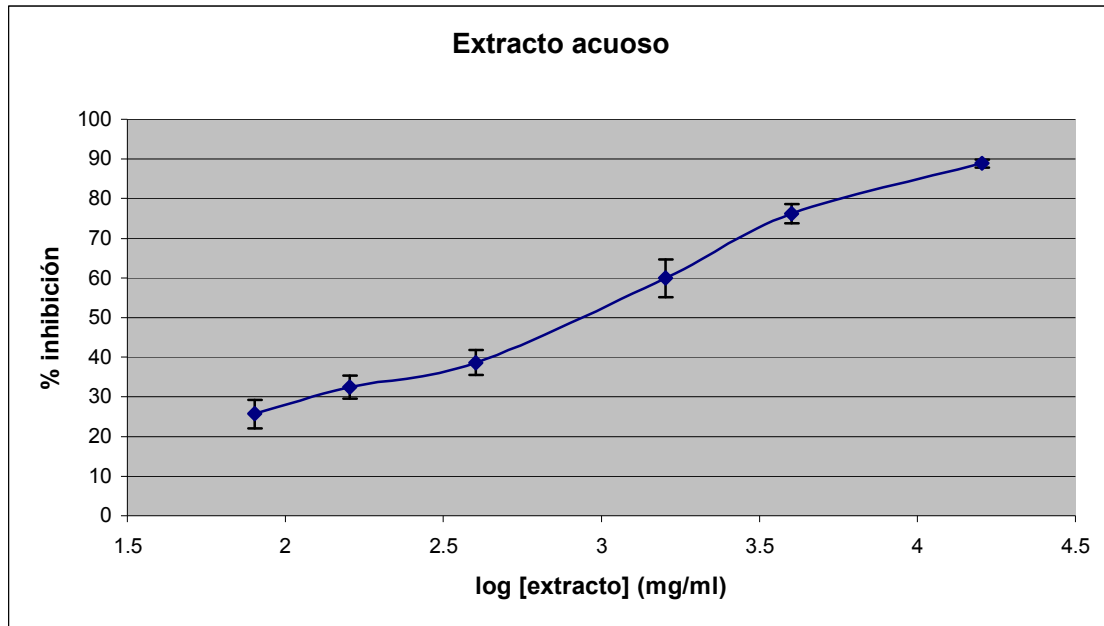


Figura 18 – Curva dosis – respuesta del extracto acuoso de *E. dioeca*, en la inhibición de  $\alpha$ -glucosidasas.

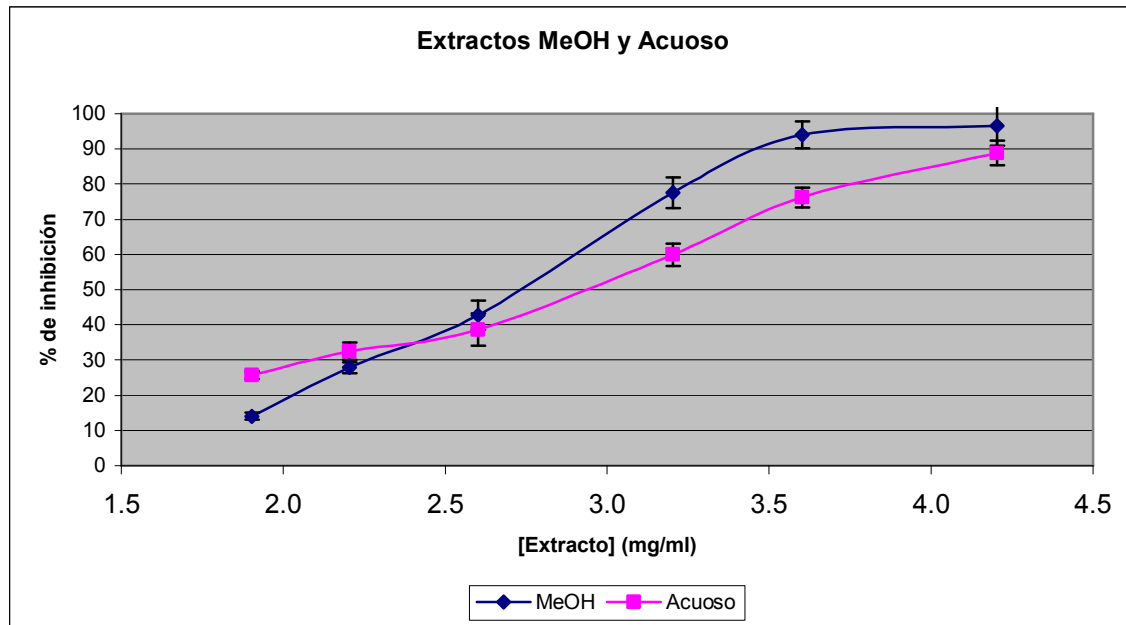


Fig. 19 – Curva dosis-respuesta de los extractos metanólico y acuoso de *E. dioeca*

En la curva dosis – respuesta para los extractos de *E. dioeca* se puede ver que el extracto metanólico presenta mayor porcentaje de inhibición de  $\alpha$ -glucosidasas con respecto al extracto acuoso (Apéndice 1, Cuadros 5 y 6, Figura 19), sin embargo, esta respuesta no se repite a todas las concentraciones evaluadas, ya que a 0.08 y 0.16 mg/ml el extracto acuoso muestra mayores porcentajes de inhibición que el extracto metanólico. Esta característica queda claramente representada al visualizar el cruce entre las curvas que cada extracto describe.

Por otro lado, la curva dosis – respuesta se asintotiza en distintas zonas en cada uno de los extractos; en el caso del extracto metanólico esto sucede en las concentraciones más altas (4 y 16 mg/ml), mientras que en el caso del extracto acuoso ocurre en las concentraciones más bajas (0.08 y 0.16 mg/ml); y en ambos casos, el fenómeno que se observa en la gráfica está apoyado en las pruebas estadísticas que se realizaron, es decir, no hay diferencias significativas entre las respuestas inhibitorias en la zona donde se estabiliza la gráfica.

Las zona de aplanamiento en la curva dosis – respuesta del extracto metanólico significa que se ha llegado al nivel máximo de respuesta o actividad inhibitoria de  $\alpha$ -glucosidasas, por más que se aumente la dosis, no se conseguirá mayor respuesta. En el caso de la curva dosis – respuesta del extracto acuoso se encuentra que aunque la dosis mínima varíe, la respuesta obtenida será similar; esto está relacionado con la mayor

respuesta inhibitoria de  $\alpha$ -glucosidasas que el extracto acuoso presenta a concentraciones bajas.

En cuanto a la DE<sub>50</sub> de los extractos de *E. dioeca*, fue la del extracto metanólico la más baja; sin embargo, la del extracto acuoso es también notable. Los valores presentados permiten proponer a *E. dioeca* como un candidato al desarrollo de fitofármacos enfocados al control de la diabetes mellitus tipo 2, pues su actividad *in vitro* fue bastante prometedora.

En conclusión los extractos metanólico y acuoso de *E. dioeca*, independientemente de las particularidades previamente discutidas, presentaron niveles altos de inhibición de  $\alpha$ -glucosidasas *in vitro* en las condiciones en las que se llevó a cabo la prueba.

### 7.3.4. Inhibición de $\alpha$ -glucosidasas *in vivo*

#### 7.3.4.1. Informe del establecimiento del modelo experimental de diabetes mellitus tipo 2 en ratas macho cepa Long Evans

De las 35 ratas macho cepa Long Evans sometidas a la inyección de estreptozotocina (STZ), una semana después de la aplicación 30 bajaron notoriamente de peso; un promedio de 38 g, lo que se traduce en un 15% del peso promedio inicial de los animales (Cuadro 7).

El modelo de diabetes mellitus tipo 2 en rata cepa Long Evans presentó un 86% de efectividad, destacando que ningún animal murió debido a la administración de la sustancia en las semanas subsecuentes.

Cuadro 7 - Peso de las ratas cepa Long Evans una semana después de la inyección de STZ.

Peso promedio inicial	Peso promedio post dosis de STZ	% de peso perdido	Glucemia inicial promedio (mg/dl)
243.5 g	206.15 g	15.33 %	264.3

Los 30 animales no sólo presentaron una baja de peso, además mostraban otras alteraciones fisiológicas como exceso de ingesta de agua y una mayor cantidad de excreción urinaria; dichos síntomas coinciden con los presentes en los individuos diabéticos, la polidipsia, la poliuria, la pérdida de peso y niveles de glucosa altos en

sangre (American Diabetes Association, 2006). Además presentaron un promedio de 264.3 mg/dl de glucemia en sangre antes de suministrarse el almidón, corroborando este valor el estado hiperglucémico en las ratas.

Cinco de las ratas sometidas al procedimiento de inducción de diabetes, no presentaron indicios fisiológicos de poseer el padecimiento, esto se debió posiblemente a que no fueron aplicadas correctamente las inyecciones de estreptozotocina, por movimientos inherentes a las ratas no se llegó a depositar la dosis a nivel peritoneal y por tanto no se desencadenó el daño pancreático.

No obstante, los cinco animales no diabetizados se incluyeron en los grupos de estudio ya que se requerían para completar los mismos.

Cabe hacer hincapié en la necesidad de tener un modelo animal confiable para evaluar la inhibición de  $\alpha$ -glucosidasas *in vivo*, que nos permita corroborar si la acción inhibitoria de los extractos de *E. dioeca* evaluada en los sistemas *in vitro* es reproducible en un sistema complejo, pues finalmente se piensa en que pueda ser llevado a la generación de un fitofármaco que ayude al control de la diabetes mellitus tipo 2 en humanos.

#### **7.3.4.2. Ensayo de inhibición de $\alpha$ -glucosidasas *in vivo*: curva de tolerancia al almidón**

Se eligió la acarbosa como control positivo, ya que dio mejores resultados que los del ácido tánico, ambos inhibidores de  $\alpha$ -glucosidasas conocidos (Figura 20).



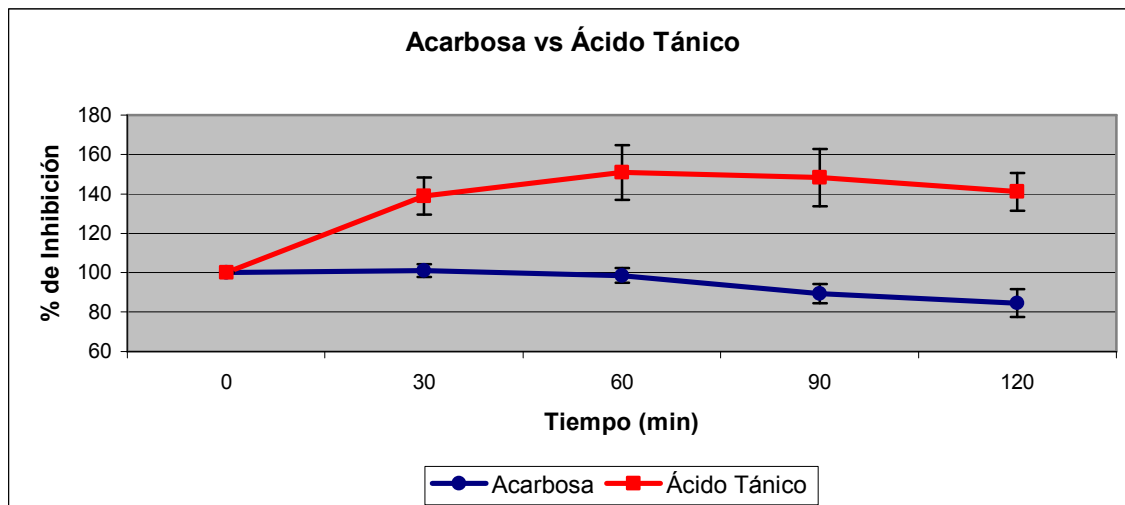


Figura 20 – Gráfica de la curva de tolerancia al almidón utilizando inhibidores conocidos de  $\alpha$ -glucosidasas: acarbosa y ácido tánico.

La curva de tolerancia al almidón mostró que el extracto metanólico (500 mg/kg) fue el mejor inhibidor enzimático en comparación con el extracto acuoso (Cuadro 8, Figura 20). El análisis de varianza mostró diferencia significativa entre los distintos tratamientos ( $F= 20.809$ ,  $P= 0.0000001$ ) (Apéndice 1, Cuadro 7); en la prueba de rango múltiple se encontraron diferencias significativas entre el extracto metanólico respecto al control negativo (sin inhibidor), y no hubo diferencias significativas entre el extracto metanólico con respecto al acuoso y del extracto acuoso con respecto al control negativo, sin inhibidor (Apéndice 1, Cuadro 8).

Al analizar la respuesta inhibitoria obtenida en cada uno de los tiempos encontramos que a los 30 minutos existe una diferencia significativa entre los tratamientos ( $F=4.861$ ,  $P= 0.0034$ ) (Apéndice 1, Cuadro 9); y la prueba de rango múltiple mostró que sólo existe diferencia significativa entre los controles (Apéndice 1, Cuadro 10).

A los 60 minutos se vuelve a encontrar diferencia significativa al analizar todos los tratamientos ( $F= 5.607$ ,  $P= 0.0013$ ) (Apéndice 1, Cuadro 11), y la prueba de rango múltiple mostró que al igual que lo ocurrido en el tiempo anterior, sólo los controles presentaron diferencias significativas (Apéndice 1, Cuadro 12).

A los 90 minutos se muestran diferencias significativas entre los tratamientos ( $F= 7.685$ ,  $P= 0.0001$ ) (Apéndice 1, Cuadro 13). En la prueba de rango múltiple, se encuentra que además de la diferencia significativa entre los controles, también el extracto acuoso

presentó diferencia significativa con respecto al control positivo, pero respecto al extracto metanólico no hubo diferencias estadísticamente significativas (Apéndice 1, Cuadro 14).

A los 120 minutos se encontró que vuelve a existir diferencia significativa al analizar todos los tratamientos juntos ( $F= 5.776$ ,  $P= 0.0011$ ) (Apéndice 1, Cuadro 15), pero al aplicar la prueba de rango múltiple se observó la misma respuesta que los 90 minutos, (Apéndice 1, Cuadro 16).

Con base en lo anterior, se puede postular que los extractos tuvieron una actividad inhibitoria favorable, y la actividad inhibitoria de  $\alpha$ -glucosidasas fue similar entre los extractos metanólico y acuoso.

Cuadro 8 - Inhibición de  $\alpha$ -glucosidasas *in vitro*, % de glucemia en sangre a lo largo de 120 min para cada tratamiento.

Tiempo	0'	30'	60'	90'	120'
<b>Tratamiento</b>					
Control -	100	124.9	137.0	143.9	134.8
Acuoso	100	115.4	119.5	129.3	121.4
Metanólico	100	105.4	116.2	122.3	121.0
Control +	100	101.1	98.6	89.3	84.6
	% de glucemia				

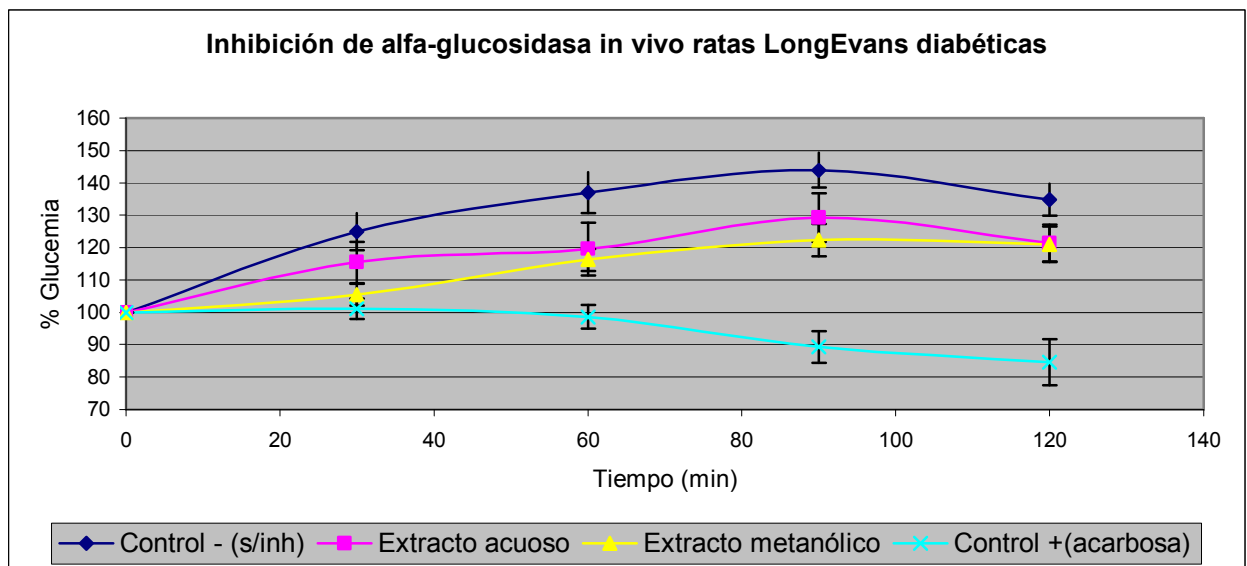


Figura 21 - Gráfica de la curva de tolerancia al almidón de los extractos metanólico y acuoso de *E. dioeca* (500 mg/kg), en un modelo de diabetes mellitus tipo 2 en rata cepa Long Evans.

Lo primero que se observó en el ensayo de inhibición de  $\alpha$ -glucosidasas *in vivo*, curva de tolerancia al almidón, es el comportamiento del control positivo elegido para efectuar la prueba. Se usó acarbosa porque presenta mejores porcentajes de inhibición que el ácido tánico, además se utilizó como inhibidor de  $\alpha$ -glucosidasas para detener la reacción en las pruebas *in vitro*; por otro lado es uno de los fármacos más prescritos para el control de la diabetes mellitus tipo 2, en el rubro de inhibidores enzimáticos, razón suficiente para ser evaluado junto con un extracto vegetal, con miras al desarrollo de fitofármacos con el mismo fin.

Sin embargo, se puede observar que no sólo evitó que se produjeran picos posprandiales, sino también bajó los niveles de glucosa en sangre; dicho fenómeno no debe haberse presentado pues no se trata de un hipoglucemiante, no es un fármaco de la familia de las sulfonilureas o tiazolidinedionas. Éste comportamiento podría ser el resultado del estado de ayuno en los animales, ya que el consumo de glucosa endógena, aunado a la dosis de acarbosa suministrada que impide cualquier hidrólisis del polisacárido, puede reflejarse en un decremento de los niveles de glucemia, confundiendo con una acción hipoglucemiante.

En cuanto al resultado de los extractos metanólico y acuoso de *E. dioeca* en el ensayo de inhibición de  $\alpha$ -glucosidasas *in vivo* se encuentra que varía con respecto a los resultados de la prueba *in vitro*, pues el porcentaje de inhibición de  $\alpha$ -glucosidasas disminuyó (aproximadamente un 45% menos), ya que se trata de un sistema complejo, un organismo vivo, en el que el extracto no llega de forma pura al tracto digestivo, se dan una serie de interacciones metabólicas en su camino.

La diferencia en el porcentaje de inhibición de  $\alpha$ -glucosidasas entre el extracto metanólico y el extracto acuoso de *E. dioeca* ya no es notoria, ambos extractos tienen un comportamiento similar, evitan los picos posprandiales, lo que se corroboró con las pruebas estadísticas, ya que no existen diferencias significativas entre la respuesta obtenida para cada extracto, aún cuando existe una tendencia del extracto metanólico a ser un mejor inhibidor.

Analizando los resultados del ensayo de inhibición de  $\alpha$ -glucosidasas en los distintos tiempos, se encuentra que el extracto metanólico de *E. dioeca* tuvo una respuesta favorable en todos los tiempos evaluados ya que al revisar los análisis estadísticos, se puede ver que el extracto metanólico nunca presentó diferencias

significativas con respecto al grupo tratado con acarbosa, su respuesta fue similar a la del control positivo.

En el caso del extracto acuoso de *E. dioeca* se encuentra que va perdiendo eficacia conforme pasa el tiempo desde su administración, ya que a los 90 y 120 minutos presentó una respuesta no favorable, teniendo diferencias significativas con respecto al grupo tratado con acarbosa, por lo que en estos dos periodos no se comportó como un inhibidor eficaz de  $\alpha$ -glucosidasas.

No obstante, de manera general, ambos extractos presentaron una inhibición de  $\alpha$ -glucosidasas semejante.

Dentro de el ensayo de inhibición de  $\alpha$ -glucosidasas *in vivo* hay que denotar que existe un problema en el método que residió en la forma en la que se tomaron las muestras de sangre, pues las ratas sufren cierto nivel de estrés que puede generar variaciones en los niveles de glucosa en sangre, por esta razón se debe buscar, en un futuro, un método menos estresante en el cual no se tenga que manipular demasiado al animal, o bien un tratamiento previo al estudio en el cual se tranquilice al animal.

Finalmente, se puede decir que los extractos metanólico y acuoso de *E. dioeca* actúan de manera similar, y que su capacidad inhibitoria de  $\alpha$ -glucosidasas es suficiente para evitar los picos posprandiales, siendo candidatos a la formulación de un fitofármaco para el control de la diabetes mellitus tipo 2.

A partir del desarrollo de los objetivos planteados al inicio de éste trabajo de investigación, los estudios fitoquímico y farmacológico de los extractos de *E. dioeca* permiten proponerla como una planta potencial en la elaboración de un fitofármaco para el control de la diabetes mellitus tipo 2.

En el estudio fitoquímico de los extractos de *E. dioeca* se encontró que el metanólico y el acuoso poseían mayor complejidad fitoquímica, caracterizada por la presencia de compuestos fenólicos, destacando los flavonoides, terpenos y fenoles, los cuales son considerados inhibidores enzimáticos, entre éstos de  $\alpha$ -glucosidasas (Scheen, 2003; Franco, 2002; Bruneton, 2001; Melo, *et al.*, 1999). Dicho resultado tuvo que ser corroborado por la evaluación farmacológica a la que fueron sujetos los extractos.

La prueba de citotoxicidad en las líneas celulares de carcinoma de colon, nasofaríngeo y cervical fue negativa para todos los extractos de *E. dioeca* pues ninguno

presentó actividad citotóxica en concentraciones igual o menores a 20 µg/ml según lo indican los estándares internacionales (Swanson y Pezzuto, 1986); por lo que no es posible proponer que los extractos de *E. dioeca* pudieran ser agentes citotóxicos para el tratamiento de carcinomas humanos, como lo sugerían los criterios quimiotaxonómicos.

Sin embargo, no se descartó que, por la abundancia de flavonoides y otros polifenólicos, los extractos polares (acuoso y metabólico) puedan tener un efecto quimioprotector a estos padecimientos

Al mismo tiempo, este resultado indica la inocuidad a nivel celular de los extractos de *E. dioeca*; fue necesario corroborar por medio de una prueba de toxicidad que una dosis aguda de los mismos que no afectan a un organismo complejo. Los resultados obtenidos de dicha prueba mostraron la sobrevivencia de todos los ratones y la ausencia de alteraciones fisiológicas y conductuales durante el periodo de evaluación.

En el caso de la prueba de inhibición de  $\alpha$ -glucosidasas *in vitro* se obtuvo el resultado esperado, concordando con la presencia de compuestos fenólicos, ya que los extractos metanólico y acuoso presentaron DE<sub>50</sub> muy prometedoras (0.432 y 0.527 mg/mL respectivamente); siendo incluso menores a las de otros extractos vegetales evaluados anteriormente (Tapia, 2006), siendo así candidatos a la producción de fitofármacos para el control de la diabetes mellitus tipo 2.

El primer paso para escalar la actividad biológica de un extracto vegetal, es la prueba en animales de laboratorio, por lo que el modelo de inducción de diabetes mellitus tipo 2 en rata macho cepa Long Evans, fue ideal para realizar la curva de tolerancia al almidón, obteniendo niveles de inhibición de  $\alpha$ -glucosidasas considerables, para pensar en la elaboración de un fitofármaco a partir de los extractos metanólico y acuoso de *E. dioeca*.

El presente estudio tiene implicaciones en la producción de un fitofármaco para el control de diabetes mellitus tipo 2, ya que presentó, en todas las pruebas realizadas, niveles consistentes de inhibición de  $\alpha$ -glucosidasas, y fue inocuo en las pruebas de citotoxicidad y toxicidad realizadas. Sin embargo, faltan otras pruebas que nos den información acerca de la toxicidad al administrar de manera crónica los extractos; estudios fitoquímicos que permitan conocer el o los compuestos activos responsables de la actividad biológica de los extractos de *E. dioeca*; y buscar las condiciones de cultivo de la planta que aseguren las características fitoquímicas de la planta en estado silvestre, permitiendo así la estandarización de los extractos.

## 8. Conclusiones

- ✓ De los cuatro extractos de *E. dioeca* evaluados (hexano, diclorometano, metanol y acuoso), el metanólico y acuoso fueron los que presentaron mayor riqueza fitoquímica. Dentro de dicha complejidad son los compuestos fenólicos (flavonoides, terpenos y fenoles) los que se relacionan con la actividad biológica de los extractos, referida a la inhibición de  $\alpha$ -glucosidasas.
- ✓ Los extractos de *E. dioeca* no presentaron actividad citotóxica en ninguna de las líneas celulares tumorales evaluadas (COLON, KB y UIISO), éste resultado está relacionado con la nula presencia de metabolitos secundarios de características citotóxicas.
- ✓ Los extractos metanólico y acuoso de *E. dioeca* mostraron actividad inhibitoria de  $\alpha$ -glucosidasas en los ensayos *in vitro* efectuados.
- ✓ Los extractos metanólico y acuoso de *E. dioeca* inhibieron las  $\alpha$ -glucosidasas y evitaron los picos posprandiales en las ratas cepa Long Evans diabetizadas; los principios activos responsables de dicha actividad se encuentran posiblemente relacionados a la presencia de compuestos fenólicos.
- ✓ Se propone a *Euphorbia dioeca* Kunth como una planta viable en la elaboración de un fitofármaco para el control de la diabetes mellitus tipo 2.

## 10. Apéndice 1: Cuadros de análisis de varianza y pruebas de rango múltiple

Efecto	G.L. efecto	C.M. efecto	G.L. error	C.M. error	Fc	N.S.
Extracto metanólico	5	4860.046	18	22.02178	220.6927	0.0000001* <sup>1</sup>

Cuadro 1- ANOVA Curva dosis - respuesta extracto metanólico de *E. dioeca*

Concentración (mg/ ml)	16	4	1.6	0.4	0.16
16					
4	0.962333				
1.6	0.000356*	0.001346*			
0.4	0.000158*	0.000158*	0.000158*		
0.16	0.000158*	0.000158*	0.000158*	0.007433*	
0.08	0.000158*	0.000158*	0.000158*	0.000158*	0.005240*

Cuadro 2 - Prueba de rango múltiple para todas las concentraciones del extracto metanólico de *E. dioeca*

Efecto	G.L. efecto	C.M. efecto	G.L. error	C.M. error	Fc	N.S.
Extracto acuoso	5	2520.006	18	12.65878	199.0718	0.0000001*

Cuadro 3 - ANOVA Curva dosis - respuesta extracto acuoso de *E. dioeca*

Concentración (mg/ ml)	16	4	1.6	0.4	0.16
16					
4	0.001183*				
1.6	0.000158*	0.000196*			
0.4	0.000158*	0.000158*	0.000158*		
0.16	0.000158*	0.000158*	0.000158*	0.240619	
0.08	0.000158*	0.000158*	0.000158*	0.002589*	0.240619

Cuadro 4 - Prueba de rango múltiple para todas las concentraciones del extracto acuoso de *E. dioeca*

<sup>1</sup> G.L.- grados de libertad; C.M.- cuadrados medios; N.S.- nivel de significancia; \* existe diferencia significativa ( $\alpha= 0.05$ )



Efecto	G.L. efecto	C.M. efecto	G.L. error	C.M. error	Fc	N.S.
Extractos	1	333.277	36	17.34028	19.2198	0.000097*
Concentraciones	5	7100.816	36	17.34028	409.4983	0.0000001*

Cuadro 5 - ANOVA Curva dosis - respuesta de los extractos metanólico y acuoso a todas las concentraciones de *E. dioeca*

Extracto	Metanólico
Acuoso	0.000211*

Cuadro 6 - Prueba de rango múltiple entre los extractos metanólico y acuoso de *E. dioeca*

Efecto	G.L. efecto	C.M. efecto	G.L. error	C.M. error	Fc	N.S.
Tratamientos	3	26700.55	491	1283.102	20.80937	0.0000001*

Cuadro 7 - ANOVA Inhibición de  $\alpha$ -glucosidasas *in vivo* de *E. dioeca* para todos los tiempos

Tratamiento	Control - (s/inhibidor)	Extracto acuoso	Extracto metanólico
Control - (s/inhibidor)			
Extracto acuoso	0.051778		
Extracto metanólico	0.013088*	0.862527	
Control + (acarbose)	0.000008*	0.000015*	0.003016*

Cuadro 8 - Prueba de rango múltiple para la inhibición de  $\alpha$ -glucosidasas *in vivo* de *E. dioeca* para todos los tiempos

Efecto	G.L. efecto	C.M. efecto	G.L. error	C.M. error	Fc	N.S.
Tratamientos	3	3145.968	95	647.0953	4.861677	0.003441*

Cuadro 9 - ANOVA Inhibición de  $\alpha$ -glucosidasas *in vivo* de *E. dioeca* a los 30 minutos

Tratamiento	Control - (s/inhibidor)	Extracto acuoso	Extracto metanólico
Control - (s/inhibidor)			
Extracto acuoso	0.489619		
Extracto metanólico	0.066732	0.631712	
Control + (acarbosa)	0.003393*	0.216418	0.956258

Cuadro 10 - Prueba de rango múltiple para la inhibición de  $\alpha$ -glucosidasas *in vivo* de *E.dioeca* a los 30 minutos

Efecto	G.L. efecto	C.M. efecto	G.L. error	C.M. error	Fc	N.S.
Tratamientos	3	7196.866	95	1283.357	5.607842	0.001389*

Cuadro 11 - ANOVA Inhibición de  $\alpha$ -glucosidasas *in vivo* de *E.dioeca* a los 60 minutos

Tratamiento	Control - (s/inhibidor)	Extracto acuoso	Extracto metanólico
Control - (s/inhibidor)			
Extracto acuoso	0.258018		
Extracto metanólico	0.241703	0.992328	
Control + (acarbosa)	0.000675*	0.185866	0.443753

Cuadro 12 - Prueba de rango múltiple para la inhibición de  $\alpha$ -glucosidasas *in vivo* de *E.dioeca* a los 60 minutos

Efecto	G.L. efecto	C.M. efecto	G.L. error	C.M. error	Fc	N.S.
Tratamientos	3	14612.12	95	1901.186	7.685789	0.000119*

Cuadro 13 - ANOVA Inhibición de  $\alpha$ -glucosidasas *in vivo* de *E.dioeca* a los 90 minutos

Tratamiento	Control - (s/inhibidor)	Extracto acuoso	Extracto metanólico
Control - (s/inhibidor)			
Extracto acuoso	0.581073		
Extracto metanólico	0.376427	0.962310	
Control + (acarbosa)	0.000176*	0.010861*	0.105886

Cuadro 14 - Prueba de rango múltiple para la inhibición de  $\alpha$ -glucosidasas *in vivo* de *E.dioeca* a los 90 minutos

Efecto	G.L. efecto	C.M. efecto	G.L. error	C.M. error	Fc	N.S.
Tratamientos	3	11959.82	95	2070.426	5.776501	0.001134*

Cuadro 15 - ANOVA Inhibición de  $\alpha$ -glucosidasas *in vivo* de *E.dioeca* a los 120 minutos

Tratamiento	Control - (s/inhibidor)	Extracto acuoso	Extracto metanólico
Control - (s/inhibidor)			
Extracto acuoso	0.733298		
Extracto metanólico	0.801175	0.999996	
Control + (acarbosa)	0.000627*	0.031342*	0.078543

Cuadro 16 - Prueba de rango múltiple para la inhibición de  $\alpha$ -glucosidasas *in vivo* de *E.dioeca* a los 120 minutos

## 9. Bibliografía

### A

AITKEN, A. 1987. The activation of protein kinase C by daphnane, ingenane and tigliane diterpenoid esters. *Botanical Journal of the Linnean Society*. Vol. 94. 247 - 163 pp.

ALEGRÍA, C. 2004. *Evaluación de la actividad hipoglucemiante de Tecoma stans(L) Juss.* Tesis Maestría en Ciencias Bioquímicas: fitoquímica y farmacología de plantas medicinales. Facultad de Medicina. Universidad Autónoma del Estado de Morelos.

American Diabetes Association. 2006. Diagnosis and classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care*. Vol. 29, suplemento 1. S43 - S48 pp.

ANDRADE-CETTO, A., Heinrich, M. 2005. Mexican plants with hypoglycaemic effect used in the treatment of diabetes. *Journal of Ethnopharmacology*. Vol. 99 325 - 348 pp.

### B

BANERJEE, S., Das, S. 2005. Anticarcinogenic effects of an aqueous infusion of cloves on skin carcinogenesis. *Asian-Pacific Journal of Cancer Prevention*. Vol. 6:3. 304 - 308 pp.

BLOCK, S., Baccelli, C., Tinant, B., Van Meervelt, L., Rozenberg, R., Habib-Jiwan, J.L., Llabrès, G., De Pauw-Gillet, M.C., Quetin-Leclercq, J. 2004. Diterpenes from the leaves of *Croton zambesicus*. *Phytochemistry*. Vol. 65:8. 1165 - 1171 pp.

BROSIUS, F. 2003. Low-dose streptozotocin induction protocol. University of Michigan Medical Centre. *Animal Models of Diabetic Complications Consortium*. Version 1. E.U.A.  
1 - 3 pp.

BRUNETON, J. 2001. *Farmacognosia: fitoquímica de las plantas medicinales*. 2º ed., Ed. Acribia. España.  
1099 pp.

BÜSSING, A., Stein, G.M., Herterich-Akinpelu I., Pfüller U. 1999. Apoptosis-associated generation of reactive oxygen intermediates and release of pro-inflammatory cytokines in human lymphocytes and granulocytes by extracts from the seeds of *Acalypha wilkesiana*. *Journal of Ethnopharmacology*. Vol. 66:3.  
301 - 309 pp.

## C

CAÑIGUERAL, S., Vila, R. 2003. *La fitoterapia racional. Fitoterapia: vademécum*. 4º ed. Ed. Masson. España.  
500 pp.

CHIEN-MIN, Y. 2005. Acetone, ethanol and methanol extracts of *Phyllanthus urinaria* inhibit HSV-2 infection in vitro. *Antiviral Research*.

CORTEZ-GALLARDO, V., Macedo-Ceja, J.P., Hernández-Arroyo, M. y Arteaga-Aureoles, G. 2004. Farmacognosia: breve historia de sus orígenes y su relación con las ciencias médicas. *Revista Biomédica*. Vol. 15.  
123 - 136 pp.

## D

DAVIS, S.N., Granner, D.K. 2001. Insulina, hipoglucemiantes orales y propiedades farmacológicas del páncreas endócrino. *Goodman & Gilman: las bases farmacológicas de la terapéutica*. 10° ed. Mc Graw Hill. Vol. II Cap. 61  
1697 - 1733 pp.

DE-JI, P., Hu, C.Q., Chang, J.J., Tung-Ying Lee, T., Chen, Y.P., Hsu, H.Y., Mcphail, D.R., Mcphail, A.T., Lee, K.H. 1991. Kansuiphorin-C and -D, cytotoxic diterpenes from *Euphorbia kansui*. *Phytochemistry*. Vol. 30:3.  
1018 - 1020 pp.

DEL BARRIO, G. 2000. Evaluation of the antiviral activity of an aqueous extract from *Phyllanthus orbicularis*. *Journal of Ethnopharmacology*. Vol. 72: 1 - 2.  
317 - 322 pp.

DOMINGUEZ, X.A., 1973. *Métodos de investigación fitoquímica*. Editorial Limusa. México.  
281 pp.

## E

EVANS, P.J., Schmidt, R.J. 1980. Plants and plant products that induce contact dermatitis. *Publications in Medicine*. Vol. 38  
289 - 316 pp.

## F

FRANCO, O.L., Ridgen, D.J., Melo, F.R., Grossi-de-Sá, M.F. 2002. Plant  $\alpha$ -amylase inhibitors and their interaction with insect  $\alpha$ -amylases: structure, function and potential for crop protection. *European Journal of Biochemistry*. Vol. 269.  
397 - 412 pp.

## G

GERTSCH, J., Niomawë, Gertsch-Roost, K., Sticher, O. 2004. *Phyllanthus piscatorum*, ethnopharmacological studies on a women's medicinal plant of the Yanomamï Amerindians. *Journal of Ethnopharmacology*. Vol. 91: 2-3. 181 - 188 pp.

GÓMEZ PERALTA, F. 2005. *Diabetes mellitus tipo 2*. Departamento de endocrinología y nutrición. Clínica universitaria de Navarra. España.

*Guía México desconocido: plantas medicinales*. 2001. Editorial México Desconocido SA de CV. México. 9,37 - 38, 59 - 60 pp.

## H

HIRSCHHORN, R., Huie, M.L., Kasper, J.S. 2002. Computer assisted cloning of human neutral  $\alpha$ -glucosidase C (GANC): A new paralog in the glycosyl hydrolase gene family 31. *PNAS*. Vol. 99: 21. 13642 - 13646 pp.

HNATYSZYN, O., Miño, J., Ferraro G., Acevedo C. 2002. The hypoglycemic effect of *Phyllanthus sellowianus* fractions in streptozotocin induced diabetic mice. *Phytomedicine*. Vol. 9:6. 556 - 559 pp.

## I

IGARASHI, M., Miyazawa, T. 2000. Newly recognized citotoxic effect of conjugated trienic fatty acids on cultured human tumor cells. *Cancer Letters*. Vol. 48:2. 173 - 179 pp.

## K

KIO, A. y Evans, F. 1981. Macrocyclic diterpene esters of the cytotoxic fraction from *Euphorbia kamerunica*. *Phytochemistry*. Vol. 20:11. 2535 - 2537 pp.

## L

LINARES, E., Flores, P., y Bye, R. 1990. *Selección de plantas medicinales de México*. Noriega Editores. México. 125 p.

LONG, L., Lee, S.K., Chai, H.B., Rasoanaivo, P., Gao, Q., Navarro, H., Wall, M.E., Wani, M.C., Farnsworth, N.R., Cordell, G.A. 1997. Novel bioactive phenanthrene derivatives from *Domohinea perrieri*. *Tetrahedron*. Vol. 53:46. 15663 - 15670 pp.

LÓPEZ GARCÍA, V. 2002. El alcance y la fuerza integradora de la medicina naturista en la interpretación y curación de las enfermedades crónico-degenerativas. Premio AEMN 2002. *Asociación española de médicos naturistas*. España.

LYNN, K.R. Clevette-Radford, L.A. 1987. Biochemical properties of latices from Euphorbiaceae. *Phytochemistry*. Vol. 26:4. 939 - 944 pp.

## M

MAJEKODUNMI, O., Zeng, L., Ohayagha, J.E., McLaughlin, J.L. 1996. New 19-acetoxyingol diterpenes from the latex of *Euphorbia poisonii* (Euphorbiaceae). *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. Vol. 4:10. 1679 - 1683 pp.

MARTINEZ-GORDILLO, M. 2002. Los géneros de la familia Euphorbiaceae en México. *Anales del Instituto de Biología, Serie Botánica*. Vol. 73:2. 155-282 pp.



McVAUGH, R. 1993. Euphorbiae Novo-Galiciana Revisae. *Contr. University of Michigan Herbarium*. Vol. 19  
207 - 239 pp.

MELO, F.R., Sales, M., Pereira, L., Bloch, C., Franco, O., Ary, M. 1999.  $\alpha$ -amylase inhibitors from Cowpea seeds. *Protein and peptides letters*. Vol. 6, no. 6.  
385 - 390 pp.

MENDEZ, I. 1976. Comparación de las medias de población. *Comunicaciones técnicas*. Vol. 3. No. 17. Serie azul: monografías. IIMAS, UNAM. México.

MENDEZ, I. 1990. *El protocolo de investigación: lineamientos para su elaboración y análisis*. 2° ed. Ed. Trillas. México.  
210 pp.

## O

ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPEMENT.  
2000. *Protocol 423: guideline for the testing of chemicals*. OECD.  
14 pp.

ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD. 2000. *Situación reglamentaria de los medicamentos: una reseña mundial*. OMS.  
52 pp.

## P

PERDUE, G.P. 1979. South American plants: taspine isolation and anti-inflammatory activity. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. Vol. 68:1.  
124 - 126 pp.

PERMUT, A.M., Wasson, J., Cox, N. 2005. Genetic epidemiology of diabetes. *The Journal of Clinical Investigation*. Vol. 115:6.  
1431 - 1439 pp.

## R

RAO, T.P., Sakaguchi, N., Juneja, L.R., Wada, E., Yokozama, T. 2005. Amla extracts reduce oxidative stress in streptozotocin induced diabetic rats. *Journal of Medicinal Food*. Vol.8:3.  
362 - 368 pp.

RIZK, A-F. 1987. The chemical constituents and economic plants of the Euphorbiaceae. *Botanical Journal of the Linnean Society*. Vol. 94  
293 - 326 pp.

ROENGSUMRAN, S., Petsom, A., Kuptiyanuwat, N., Vilaiwan, T., Ngamrojnavanich, N., Chaichantipyuth C., Phuthong, S. 2001. Cytotoxic labdane diterpenoids from *Croton oblongifolius*. *Phytochemistry*. Vol. 56:1.  
103 - 107 pp.

## S

SCHEEN, A.J. 2003. Is there a role for  $\alpha$ -glucosidase inhibitors in the prevention of type 2 diabetes mellitus. *Drugs*. Vol. 63:10.  
933 - 951 pp.

SCHROEDER, G., Rohmer, M., Beck J. P., Anton R. 1980. 7-Oxo-, 7 $\alpha$ -hydroxy- and 7 $\beta$ -hydroxysterols from *Euphorbia fischeriana*. *Phytochemistry*. Vol. 19:10  
2213 - 2215 pp.

SECRETARÍA DE SALUD. 2005. *Comunicado de prensa No. 628*, 12 de Noviembre de 2005

SEIGLER, D.S. 1994. Phytochemistry and systematics of the Euphorbiaceae. *Annals of the Missouri Botanical Garden*. Vol. 81  
380 - 401 pp.

SEQUEIROS, C., López L., Néstor O. Caffini, N., Natalucci, C. 2003. Proteolytic activity in some Patagonian plants from Argentina. *Fitoterapia*. Vol. 74:6.  
570 - 577 pp.

SEVIL, O., Gürek, F., Gil, R., Pengsuparp, T., Pezzuto, J.M., Cordell, G.A. 1995. Four diterpene esters from *Euphorbia myrsinites*. *Phytochemistry*. Vol. 38:6.  
1457 - 1462 pp.

STANDLEY, P.C., Styemark, J.A. 1949. Flora of Guatemala. *Fieldiana*. Botany Chicago Natural History Museum. Vol. 24:6.  
99 - 100 pp.

SWANSON, S.M., Pezzuto, J.M. 1986. *Bioscreening for antitumor activity: evaluation of cytotoxic potential and ability to inhibit macromolecule biosynthesis*. National Cancer Institute. E.U.A.

## T

TAPIA, M.A. 2006. *Búsqueda de extractos vegetales inhibidores de glucosidasas intestinales para el control de la diabetes mellitus*. Tesis Licenciatura. Facultad de Biología. Universidad Autónoma del Estado de Morelos.

TSACHEVA, I. Rostan, J., Iossifova, T., Vogler, B., Odjakova, M., Navas, H., Kostova, I., Kojouharova, M., Kraus W. 2004. Complement inhibiting properties of dragon's blood from *Croton draco*. *Journal of Biosciences*. Vol. 59: 7-8.  
528 -532 pp.

## V

*Vigilancia epidemiológica*. 2004. Semana 21. Secretaría de Salud. México.

## W

WANG, H.X. 2001. Examination of Lectins, Polysaccharopeptide, Polysaccharide, Alkaloid, Coumarin and Trypsin Inhibitors for Inhibitory Activity Against Human Immunodeficiency Virus Reverse Transcriptase and Glycohydrolases. *Planta Medica*. Vol.67. 669 - 672 pp.

WURDAKC, K.J., Hoffmann, P., Chase, M.W. 2005. Molecular phylogenetic análisis of uniovulate Euphorbiaceae (Euphorbiaceae *sensu stricto*) using plastid *RBCL* and *TRNL-F* DNA sequences. *American Journal of Botany*. Vol. 92:8 1397 - 1420 pp.

## Y

YA - FAN, L., Hung, H.Y., Chang, W.H., Tsay, G.J., Hour, T.C., Hung, H.C., Liu, G.Y. 2005. The PKC delta inhibitor, rottlerin, induces apoptosis of hematopoietic cell lines through mitochondrial membrane depolarization and caspases cascade. *Life Sciences*. Vol. 77:6. 707 - 719 pp.

## **Páginas de Internet consultadas**

Animal Models of Diabetes Complications Consortium:  
<http://www.amdcc.org/shared/protocols.asp> (Fecha de consulta: 23/02/06)

Bayer Pharmaceuticals (Glucobay®): <http://www.glucobay.com> (Fecha de consulta: 11/03/06)

Dr. Duke's phytochemical and ethnobotanical database: <http://sun.ars-grin.gov:8080/npgspub/xsql/duke/plantdisp.xsql?taxon=247> (Fecha de consulta: 23/02/06)

Missouri Botanical Garden: <http://mobot.mobot.org> (Fecha de consulta: 23/02/06)

National Cancer Institute: <http://www.cancer.gov> (Fecha de consulta: 23/02/06)

National Library of Medicine: <http://www.nlm.nih.gov> (Fecha de consulta: 23/02/06)

Organización Mundial de la Salud: <http://www.who.int> (Fecha de consulta: 23/02/06)

Secretaría de Salud: <http://www.salud.gob.mx> (Fecha de consulta: 23/02/06)